

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 21/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/47536 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. September 1999 (23.09.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00755 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. März 1999 (18.03.99) (30) Prioritätsdaten: 198 12 103.2 19. März 1998 (19.03.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BERNAUER, Annette [DE/DE]; Weberstrasse 38, D-79249 Merzhausen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, MX, PL, RU, SG, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR CONDUCTING THE SYNTHESIS OF NUCLEIC ACID MOLECULES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON NUCLEINSÄUREMOLEKÜLEN (57) Abstract The invention relates to a method for conducting the synthesis of nucleic acid molecules. The invention especially relates to a method which is carried out in a recursive manner. The nucleic acid constituents are preferably of a synthetic or semisynthetic origin. According to the inventive method, an additional nucleic acid molecule is attached to and/or coupled with a prepared nucleic acid molecule. The end of the prepared nucleic acid molecule is masked if no additional nucleic acid molecule is attached to or coupled with the same. The additional nucleic acid molecule is split at a predetermined point, resulting in an end to or with which an additional nucleic acid molecule can be attached and/or coupled. The aforementioned method steps can be repeated as often as required until the desired product is synthesized. The invention also relates to a kit for carrying out the inventive method. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuremolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein derartiges Verfahren, das rekursiv durchgeführt wird. Die Nucleinsäurekomponenten sind vorzugsweise synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs. Das Prinzip des erfindungsgemässen Verfahrens beruht darauf, dass an bzw. mit einem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül ein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder verknüpft wird, das Ende des bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls maskiert wird, falls an dieses bzw. mit diesem kein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder verknüpft wurde, das weitere Nucleinsäuremolekül an einer vorbestimmten Stelle gespalten wird, wobei vorzugsweise wiederum ein Ende entsteht, an das bzw. mit dem ein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder verknüpft werden kann, und die vorgenannten Verfahrensschritte gegebenenfalls so oft wiederholt werden, bis das gewünschte Produkt synthetisiert ist. Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuremolekülen

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuremolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein derartiges Verfahren, das rekursiv durchgeführt wird. Die Nucleinsäurekomponenten sind vorzugsweise synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs. Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht darauf, daß an bzw. mit einem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül ein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/ oder verknüpft wird, das Ende des bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls maskiert wird, falls an dieses bzw. mit diesem kein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und oder verknüpft wurde, das weitere Nucleinsäuremolekül an einer vorbestimmten Stelle gespalten wird, wobei vorzugsweise wiederum ein Ende entsteht, an das bzw. mit dem ein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und oder verknüpft werden kann, und die vorgenannten Verfahrensschritte gegebenenfalls so oft wiederholt werden, bis das gewünschte Produkt synthetisiert ist. Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
- 15 Rekombinante Techniken zur Manipulation von Nucleinsäuren haben in den letzten zwanzig Jahren vielen wissenschaftlichen Disziplinen, aber auch der pharmazeutischen Industrie sowie der medizinischen Forschung einen enormen Auftrieb verliehen. In vielen Anwendungsbereichen ist es wünschenswert, ein Nucleinsäuremolekül mit genau definierter Sequenz auf möglichst einfache Weise mit lediglich geringem Zeit- und Kostenaufwand bereitzustellen. Die gegenwärtig am weitesten verbreiteten Verfahren zur Bereitstellung derartiger Nucleinsäuremoleküle beinhalten die Clonierung von DNA beispielsweise aus cDNA-Genbanken, gegebenenfalls gekoppelt mit anschließender Sequenzierung der isolierten cDNA. Andererseits kann DNA mit gewünschter Sequenz synthetisch, beispielsweise über das konventionelle Phosphoramidit-Verfahren, hergestellt werden.
- 25 Übliche Verfahren zur Bereitstellung gewünschter doppelsträngiger Nucleinsäuremoleküle werden nachfolgend am Beispiel der Bereitstellung von DNA-Molekülen erläutert. Interessierende DNA-Moleküle müssen beispielsweise durch eine cDNA- oder Positionierungsclonierung isoliert und in geeignete Vektoren cloniert werden. Die Vermehrung der resultierenden Vektoren und damit der interessierenden DNA-Moleküle erfolgt „in vivo“. Dazu müssen die Vektoren in geeignete Wirtszellen, beispielsweise Bakterien oder Hefen, eingebracht werden. Zur weiteren Manipulation der DNA, beispielsweise für die Bereitstellung abgewandelter Konstrukte, die neue phänotypische Eigenschaften vermitteln, muß die DNA wieder aus den Wirtsorganismen isoliert werden. Erst dann steht sie wieder für Manipulationszwecke zur Verfügung. Zur weiteren Vermehrung muß sie wiederum in geeignete Wirtsorganismen eingebracht werden. Somit sind oft viele Verfahrensschritte und/oder umständliche Manipulationen notwendig, um eine gewünschte DNA zu erzeugen. Es ist auch leider vorstellbar und dem Fachmann wohl bekannt, daß sich dieser Aufwand noch vervielfacht, sofern eine größere Anzahl an verschiedenartigen DNAs hergestellt werden soll.
- 40 Ein weiteres, im Stand der Technik bekanntes Verfahren für die „in vitro“-Synthese von doppelsträngiger DNA ist die PCR-Technik. Voraussetzung für eine derartige Herstellung ist die Verfügbarkeit geeigneter Matrizen-DNA. Die Subklonierung geeigneter DNA-Fragmente und die unter Umständen langwierige

Einstellung der richtigen Reaktionsbedingungen für die PCR können die experimentellen Arbeiten beträchtlich verzögern.

Die vorstehend beschriebenen, im Stand der Technik bekannten Verfahren sind immer noch relativ zeit- und damit auch kostenaufwendig. Zudem sind sie, wie im Falle der cDNA-Clonierung, nicht immer ohne weiteres erfolgreich. Die synthetische Generierung von längeren Nucleinsäurefragmenten bereitet in der Praxis oft wesentliche Schwierigkeiten. Auch die Generierung von DNA durch PCR, obwohl sie die DNA-Rekombinationstechnik weit vorangetrieben hat, kann im Einzelfall nicht von Erfolg gekrönt sein oder auf Schwierigkeiten stoßen, wie vorstehend beschrieben wurde.

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Verfahren bereitzustellen, das die Synthese von Nucleinsäuremolekülen gewünschter Sequenz und Länge auf einfache und zeitsparende Weise ermöglicht. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

15

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuremolekülen, das die folgenden Schritte teilweise oder vollständig umfaßt:

1. Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das mindestens ein Ende aufweist, das eine Anlagerung und/ oder Verknüpfung von bzw. mit einem weiteren Nucleinsäuremolekül erlaubt;
- 20 2. Anlagerung und/ oder Verknüpfung mindestens eines weiteren Nucleinsäuremoleküls an das bzw. mit dem Nucleinsäuremolekül, wobei das eine Ende des mindestens einen weiteren Nucleinsäuremoleküls an das bzw. mit dem mindestens eine(n) Ende des Nucleinsäuremoleküls angelagert und/ oder verknüpft wird, und das andere Ende des mindestens einen weiteren Nucleinsäuremoleküls im Falle einer Verknüpfung maskiert ist;
- 25 3. Gegebenenfalls Maskierung des mindestens einen Endes des Nucleinsäuremoleküls, an das bzw. mit dem kein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder verknüpft wurde;
4. Spaltung des mindestens einen weiteren angelagerten und/oder verknüpften Nucleinsäuremoleküls an einer vorbestimmten Stelle, wobei die Maskierung entfernt wird, und ein Ende erzeugt wird, das eine Anlagerung und/oder Verknüpfung von bzw. mit einem weiteren Nucleinsäuremolekül erlaubt;
- 30 und
5. Mindestens ein-, gegebenenfalls mehrmalige Wiederholung der Schritte (2) bis (4), wobei in Schritt (2) jeweils geeignete Nucleinsäuremoleküle eingesetzt werden.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das weitere Nucleinsäuremolekül ein Nucleinsäure-Einzelstrangmolekül.

35

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren nach Schritt (2) folgenden Schritt:

- (2a) Auffüllung des zweiten zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nucleinsäurestrangs durch eine Polymeraseaktivität, wobei gegebenenfalls zuvor die Maskierung entfernt wird.

40

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren nach Schritt (4) oder (5) folgenden Schritt:

(4/5a) Auffüllung des zweiten, zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nucleinsäurestrangs durch eine Polymeraseaktivität.

5

Wie vorstehend erwähnt, eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese von einzelsträngiger (dsDNA) oder partiell doppelsträngiger DNA.

Das Prinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 1 dargestellt. Weitere Ausführungsformen sind
10 in den Fig. 2 bis 7 dargestellt.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein einzelsträngiges Nucleinsäuremolekül, ein partiell doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit einem überhängenden 5'- oder 3' - Ende oder ein doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit einem glatten Ende bereitgestellt. An dieses Ende
15 des bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls wird im nächsten Schritt mit Hilfe einer Ligaseaktivität, beispielsweise einer T4-RNA-Ligase, ein einzelsträngiges Nucleinsäuremolekül kovalent gebunden. Das einzelsträngige Nucleinsäuremolekül kann dabei mit seinem 5' - Phosphat- oder 3' - Hydroxy - Ende an das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül gebunden werden. Dementsprechend umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren eine Nucleinsäuresynthese in 3' -5' - oder in 5' -3' -Richtung (von der
20 Orientierung der Vorläufermoleküle ausgehend). In diesen Ausführungsformen ist es wesentlich, daß das Ende des einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls, das nicht mit dem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül verknüpft wird, maskiert ist. Maskiert bedeutet in diesem Sinne der vorliegenden Erfindung, daß dieses Ende in diesem Ligationsansatz nicht mit einem anderen einzelsträngigen Nucleinsäuremolekül der gleichen Art verknüpft werden kann, und dadurch einzelsträngige Moleküle entstehen, die aus
25 mehreren Kopien des gleichen Nucleinsäuremoleküls bestehen und ebenfalls mit dem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül verknüpft werden können. Im Sinne der Erfindung ist eine Maskierung eine chemische, enzymatische oder sonstige Modifikation desjenigen Endes, das die o.g. Verknüpfung verhindert. Maskierungen im Sinne dieser Erfindung werden nachfolgend noch genauer beschrieben. Nach der Ligation werden die Enden der bereitgestellten Nucleinsäuremoleküle maskiert, die mit keinem
30 einzelsträngigen Nucleinsäuremolekül verknüpft worden sind. Im nächsten Schritt wird das einzelsträngige Nucleinsäuremolekül, das an das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül ligiert wurde, an einer vorbestimmten Stelle gespalten, wobei die Maskierung entfernt und ein Ende erzeugt wird, das eine Verknüpfung mit einem nächsten einzelsträngigen Nucleinsäuremolekül erlaubt. Durch die beiden letzten Schritte gewährleistet das erfindungsgemäße Verfahren in vorteilhafter Weise, daß in weiteren
35 Ligationsschritten nur diejenigen Nucleinsäuremoleküle weiter verlängert werden, an die im vorangegangenen Schritt ein einzelsträngiges Nucleinsäuremolekül ligiert wurde. Der Ligations-, Maskierungs- und Spaltungsschritt kann in dieser Reihenfolge mit jeweils neu anzulagernden Molekülen nun beliebig oft wiederholt werden, wobei jeweils geeignete einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle eingesetzt werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach der Synthese des kompletten gewünschten Einzelstrangs der in seiner Sequenz komplementäre Gegenstrang mit einer Polymeraseaktivität synthetisiert. Wurde der Einzelstrang in 3' – 5' – Richtung synthetisiert und wurde ein doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit einem glatten Ende oder ein
5 partiell doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül bereitgestellt, kann der komplementäre Nucleinsäurestrang direkt von dem freien 3' – Ende des bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls synthetisiert werden. Wurde jedoch ein einzelsträngiges Nucleinsäuremolekül bereitgestellt und erfolgt die Synthese des Einzelstrangs in 3' – 5' – Richtung, muß über Hybridisierung eines geeigneten einzelsträngigen Nucleinsäureoligomers an das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül vor der Polymerasereaktion ein 3' –
10 Ende zur Verfügung gestellt werden. Erfolgte die Synthese des Nucleinsäureeinzelstrangs in 5' – 3' – Richtung, wird das letzte einzelsträngige Nucleinsäuremolekül, das an den synthetisierten Nucleinsäureeinzelstrang ligiert wird, vorteilhafterweise so gewählt, daß das 3' – Ende eine Haarnadelstruktur ausbildet, so daß nach Spaltung der Haarnadelstruktur ein 3' – Ende für die Synthese des komplementären Nucleinsäurestranges durch eine Polymeraseaktivität zur Verfügung gestellt wird.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird direkt nach (jeder) Spaltung des ligierten einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls vor der Ligation des nächsten einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls der entsprechende komplementäre Nucleinsäurestrang mittels einer Polymeraseaktivität synthetisiert. Im wesentlichen wird ansonsten dabei verfahren, wie vorstehend
20 für die Synthese des kompletten komplementären Nucleinsäurestrangs beschrieben. Im Falle einer 5' – 3' – Syntheserichtung wird dabei jedes Nucleinsäure – Einzelstrangmolekül so gewählt, daß es am 3' – Ende vorteilhafterweise eine Haarnadelstruktur ausbildet. Zusätzlich wird vor der Polymerasereaktion, die vor der Maskierung der Enden der bereitgestellten Nucleinsäuremoleküle erfolgt, die Maskierung am 3' – Ende des ligierten Nucleinsäuremoleküls entfernt.

25 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die weiteren Nucleinsäuremoleküle, die an das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder damit verknüpft werden, doppelsträngig. In dieser Ausführungsform ist das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül einzelsträngig oder partiell doppelsträngig mit einem überhängenden 3'– oder 5'-Ende. Besitzt das
30 weitere Nucleinsäuremolekül ein entsprechendes, in seiner Sequenz komplementäres, überhängendes 3'- oder 5'-Ende, findet eine Anlagerung durch Hybridisierung der einzelsträngigen überhängenden Enden statt. Vorzugsweise ist das andere Ende des weiteren Nucleinsäuremoleküls glatt. Durch die vorstehend beschriebene Maskierung ist gewährleistet, daß an dieses Ende keine Anlagerung über Hybridisierung kohäsiver Enden von weiteren Nucleinsäuremolekülen der gleichen Art stattfindet.

35 In einer wiederum anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das weitere Nucleinsäuremolekül einzelsträngig und es findet eine Anlagerung an das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül über Hybridisierung von komplementären endständigen Nucleotiden statt. In dieser Ausführungsform ist das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül einzelsträngig oder partiell doppelsträngig
40 mit einem überhängenden 3'- oder 5'-Ende. Gegebenenfalls kann das einzelsträngige weitere Nucleinsäuremolekül zusätzlich kovalent mit dem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül mittels einer

- Ligaseaktivität verknüpft werden. Findet die Hybridisierung über 3' – endständige Nucleotide statt, kann im nächsten Schritt mittels einer Polymeraseaktivität der komplementäre Strang synthetisiert werden. Findet die Hybridisierung über 5'- endständige Nucleotid statt, wird das 3'-Ende des weiteren einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls so gewählt, daß es eine Haarnadelstruktur ausbildet, so daß ein
- 5 3' - Ende für die anschließende Polymerisationsreaktion zur Synthese des komplementären Nucleinsäurestrangs bereitgestellt wird. Im nächsten Schritt wird der synthetisierte Nucleinsäuredoppelstrang an einer vorbestimmten Stelle gespalten, wobei die für die Spaltung notwendige Erkennungssequenz und das glatte Ende bzw. die Haarnadelstruktur entfernt wird und ein vorzugsweise kohäsives Ende entsteht, das eine Anlagerung über Hybridisierung und gegebenenfalls eine kovalente Verknüpfung des
- 10 Nucleinsäuremoleküls mit einem weiteren einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls erlaubt.

- Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem Verfahren, deren Anlagerungs-, Maskierungs- und/oder Spaltungsschritte Kombinationen der entsprechenden Schritte der vorgenannten Ausführungsformen darstellen. So kann beispielsweise in einem ersten Syntheszyklus ein einzelsträngiges Nucleinsäure-
- 15 molekül kovalent mit einem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül verknüpft werden, anschließend der komplementäre Nucleinsäurestrang synthetisiert werden, der Doppelstrang wie vorstehend beschrieben gespalten werden, und im nächsten Syntheszyklus ein weiteres einzelsträngiges Nucleinsäuremolekül über Hybridisierung angelagert werden.
- 20 Werden einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle mittels einer Ligaseaktivität mit einem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül verknüpft, muß die Synthese des komplementären Nucleinsäurestrangs nicht nach jedem Anlagerungs-, Maskierungs- und/oder Spaltungsschritt oder am Ende der Synthese des kompletten Nucleinsäureeinzelstrangs erfolgen. Der Zeitpunkt des Auffüllens des komplementären Stranges kann beliebig gewählt werden, in dem Sinne, daß er beispielsweise nach einem beliebigen permutierendem
- 25 Anlagerungs-, Maskierungs- und/ oder Spaltungsschritt gewählt wird.

- Der Begriff „Maskierung“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß eine kovalente Verknüpfung zweier Nucleinsäuremoleküle nicht möglich ist. Maskierte einzelsträngige 3'-Enden können beispielsweise durch den Einbau eines Aminoblocks, eines Didesoxynucleotids, eines 3'-Phosphats oder
- 30 durch ein künstlich eingebautes 5'- Ende erzeugt werden. Maskierte einzelsträngige 5'-Enden zeichnen sich im Sinne der vorliegenden Erfindung beispielsweise durch eine fehlende Phosphatgruppe oder durch den Einbau von einem 5'-modifizierten Nucleotid (z.B. Biotin-dNTP, Digoxigenin-dNTP) aus. Findet eine Verlängerung eines bereitgestellten Nucleinsäuremoleküls über Hybridisierung komplementärer, endständiger Nucleotide statt, so wird ein doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit einem glatten Ende,
- 35 an das kein weiteres Nucleinsäuremolekül mit seinen endständigen Nucleotiden hybridisieren kann, im Sinne der vorliegenden Erfindung auch als maskiert bezeichnet. Ein partiell doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit überhängenden einzelsträngigen Enden kann somit maskiert werden, indem ein überhängendes 3'-Ende mittels einer Exonucleaseaktivität entfernt wird, oder der komplementäre Strang zu einem überhängenden 5'-Ende mittels einer Polymeraseaktivität synthetisiert wird, so daß in beiden
- 40 Fällen ein doppelsträngiges Nucleinsäuremolekül mit glatten Enden entsteht.

Der Begriff „Bereitstellen eines Nucleinsäuremoleküls“ umfaßt jegliche Form des Bereitstellens, z.B. die Clonierung einer Gens mit anschließender Restriktionsspaltung und Isolierung eines Fragmentes mit z.B. einem überhängenden oder glatten Ende, das als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren dient. In einer anderen Ausführungsform wird das Nucleinsäuremolekül durch
5 Aneinanderlagerung von zwei mindestens teilweise komplementären synthetischen Oligonucleotiden bereitgestellt, wobei durch die Aneinanderlagerung ein Überhang entstehen kann. In einer weiteren Ausführungsform werden einzelsträngige Oligonucleotide bereitgestellt.

Der Begriff „an mindestens einem Ende“, wie erfindungsgemäß verwendet, bedeutet, daß die Synthese
10 uni- oder bidirektional verlaufen kann.

Die „Anlagerung“ der Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle erfolgt vorzugsweise durch Hybridisierung. Die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen können, falls erforderlich, vom Fachmann ohne weiteres für jeden Schritt der Anlagerung eines neuen Einzelstranges aus seinen Fachkenntnissen heraus modifiziert
15 werden.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle haben eine Länge von maximal ca. 150 Nucleotiden. Bevorzugt ist eine Länge zwischen 15 und 130 Nucleotiden. Generell ist bei der Wahl der Länge der Einzelstrangmoleküle zu beachten, daß die Ausbeute intakter
20 Oligonucleotide bei der chemischen Synthese von Einzelstrang-Vorläufermolekülen mit zunehmender Länge sinkt und zwar wegen fehlerhaften Einbaues von Nucleotiden. Es ist also ein Kompromiß einzugehen zwischen Länge der Oligonucleotide und deren Ausbeute. Einen Einfluß auf die Ausbeute an gewünschter Nucleinsäure mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hat auch die Qualität der für die Synthese eingesetzten Einzelstrangmoleküle. Durch die Oligonucleotidreinigung mit Hilfe der HPLC sind
25 die einzelnen Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle für weiterführende Synthesen intakt. Schließlich wird sich die Länge der in weiterführenden Synthesen verwendeten Oligonucleotide nach dem Mengenbedarf für einen Syntheseschritt und der Ausbeute bei der chemischen Synthese orientieren.

Der Begriff „vorbestimmte Stelle“, wie erfindungsgemäß verwendet, bedeutet, daß diese Sequenz
30 entweder durch ihre Primärsequenz oder durch ihre relative Positionierung zur eigentlichen Spaltungsstelle definiert ist.

Eine vorbestimmte Stelle zur Spaltung eines Nucleinsäureeinzelstrangs kann beispielsweise durch Inkorporation eines oder mehrerer artifizierender oder modifizierter Nucleotide, Basenanaloga oder einer
35 chemischen Gruppe, intern oder terminal, erzeugt werden, die/das mittels eines physikalischen, chemischen oder enzymatischen Verfahrens gespalten werden kann, so daß ein 3'-OH- und/oder ein 5'-Phosphat-Ende entsteht (z.B. Maxam-Gilbert-Reaktion etc.). Nucleotide, die sich für das erfindungsgemäße Verfahren eignen, sind beispielsweise 5-Hydroxy-2-desoxycytidin, 5-Hydroxy-2-desoxyuridin oder 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin. Während die ersten beiden Nucleotide Substrate für *E. coli*-Endonuclease III und Formamidopyrimidine DNA Glycosylase darstellen, kann an letzterem Nucleotid
40 mittels Uracil DNA-Glycosylase und Apyrimidase bzw. Alkali-Behandlung gespalten werden.

Beispielsweise können Phosphorannukleotide oder Thioatnukleotide in der DNA-Sequenz einen terminalen Verdau von Exonuklease II oder T7 (Gen 6) Nuklease zum Stillstand bringen, wobei die Sequenz bis zum modifizierten Nukleotid zur Spaltung vorbestimmt ist.

- 5 Eine weitere Möglichkeit zur Spaltung des Nucleinsäureeinzelstranges an einer vorbestimmten Stelle besteht in der Einführung eines „mismatches“ in einer artifiziellen Haarnadelstruktur. Mittels eines „mismatch repair“-Enzyms läßt sich diese Struktur effizient und präzise spalten.

- Welches (molekulare) Agens als Restriktionsaktivität zur Spaltung einer oder mehrerer vorbestimmter
- 10 Stellen in einem Nucleinsäuredoppelstrang im erfindungsgemäßen Verfahren letztlich Verwendung findet, ist nicht erfindungswesentlich. Wesentlich hingegen ist für Ausführungsformen, die die Spaltung von doppelsträngiger Nucleinsäure umfassen, daß, wie bereits vorstehend exemplarisch erwähnt, die Erkennungssequenz auf der Nucleinsäure und die tatsächlich gespaltene Sequenz voneinander örtlich getrennt sind. Erfindungsgemäß wird nämlich in der Regel die Erkennungssequenz durch die Spaltung
- 15 aus dem wachsenden Nucleinsäure-Doppelstrangmolekül entfernt. Die Restriktionsendonucleasen der Klasse II S besitzen Eigenschaften, die den Anforderungen an ein solches Agens entsprechen. Dabei sind je nach Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens Vertreter dieser Klasse, die ein freies, kohäsives 3'-Ende oder ein überstehendes, kohäsives 5'-Ende erzeugen, geeignet.

- 20 Die Eigenschaften der Restriktionsaktivitäten, die im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbar sind, können wie folgt zusammengefaßt werden :

- (a) das restringierende Agens kann vielfältiger Natur sein: dazu gehören alle Nucleinsäuren spezifisch spaltenden synthetischen Agenzien wie synthetische Peptide, PNA (peptide nucleic acid),
- 25 tripelhelikale DNA bindende Oligonucleotide, die für die spezifische Prozessierung des/der Nucleinsäure-Terminus/i im Sinne dieser Erfindung geeignet sind, wie auch natürlich vorkommende DNA-spaltende Enzyme. Der Fachmann ist in der Lage, für seine jeweiligen Zwecke geeignete (Exo-) Nuklease- bzw. auch Restriktionsaktivitäten einzusetzen;
- (b) diese können beispielsweise Restriktionsendonucleasen des Typs II S sein;
- 30 (c) asymmetrische Erkennungssequenzen (Restriktionsendonucleasen der Klasse II S), wie auch symmetrische Erkennungssequenzen sind dabei einsetzbar;
- (d) wie bereits vorstehend erwähnt, dürfen die Spaltstellen, die durch die Restriktionsaktivität erzeugt werden, nicht innerhalb der spezifischen Erkennungssequenz liegen, sondern müssen 5' oder 3' distal davon lokalisiert sein;
- 35 (e) die Entfernung der Schnittstelle von der Erkennungssequenz muß genau und eindeutig definiert sein;
- (f) um die Spezifität der Anlagerung des Nucleinsäure-Einzelstranges in einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zu gewährleisten und eine effiziente Ligationsreaktion zu gewährleisten, sofern diese gewünscht ist, erzeugt die Nukleaseaktivität bzw. das restringierende Agens vorzugsweise kohäsive Enden. Damit entfällt auch die vorstehend diskutierte Notwendigkeit
- 40 der Maskierung der Einzelstränge, die z.B. an die glatten Enden angelagert werden.

Eine geeignete Auswahl an restringierenden Agenzien kann der Fachmann der beigefügten Literaturliste entnehmen.

- Die Durchführung des Schrittes (5) bzw. die Häufigkeit seiner Durchführung hängt letztendlich von der Länge des gewünschten Endproduktes, als auch von der Stranglänge des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials ab.

- 10 In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein i.d.R. synthetisches, einzelsträngiges DNA-Molekül (+) zur Verfügung gestellt, dessen 5'-Terminus zur Hybridisierung mit dem 3'-Ende des vorhergehend templateabhängig synthetisierten Einzelstrang-DNA-Moleküls (-) gebracht wird. Somit wird eine i.d.R. synthetische Templatesequenz (-) zur Verfügung gestellt, die, ausgehend von dem 3'-Ende (+) des vorhergehend synthetisierten Stranges, für die Synthese eines neuen DNA-Stranges (+) zur Verfügung steht. Es entsteht dabei ein doppelsträngiger 3'-Terminus, der den Doppelstrang terminal maskiert. Der komplementäre Templatestrang kann zur Erleichterung der nachfolgenden Hybridisierungsreaktion mittels einer z.B. 5'-3' Exonukleaseaktivität ganz (Figur 8A) oder teilweise (Figur 8B) abgebaut werden. Eine interne Maskierung des Einzelstrangmoleküls (z.B. mit Boranphosphaten) dient dann dazu, den Stoppunkt der Exonuklease genau festzulegen (K.W. Porter et al., *Nucl. Acids Res.* 25(8), 1611-1617 (1997))

- 20 Die Vorteile, die die vorliegende Erfindung gegenüber dem Stand der Technik leistet, umfassen unter anderem:

1. Verfügbarkeit:

- Sequenzen von Nucleinsäuren, beispielsweise von Genen sind, sofern die Nucleotidfolgen beispielsweise aus Datenbanken bekannt sind, jederzeit, überall und schnell (innerhalb von Tagen) verfügbar. In Kenntnis dieser Sequenzen sowie der erfindungsgemäßen Lehre kann der Fachmann jedes gewünschte Nucleotidmolekül synthetisieren.

2. Lagerung und Transport:

- 30 Nucleinsäuremoleküle in der Größe von Genen müssen nicht mehr physikalisch in Kühlschränken unter hohem Energieverbrauch gelagert werden. Ihre Sequenzen können in EDV-Anlagen verwaltet, und bei Bedarf in einem biologischen System einfach synthetisiert werden. Somit entfällt auch der Transport. DNA-Sequenzen können per e-Mail verschickt werden.

3. Manipulierbarkeit:

- 35 Beliebige Nucleotidfolgen wie z.B. DNA-Sequenzen und Gensequenzen werden für das Erreichen bestimmter Eigenschaften, wie Stabilität gegenüber Hitze, pH-Änderungen oder Löslichkeit in bestimmten Lösungsmitteln wie auch der Optimierung oder Veränderung des biologischen Verhaltens ihrer Genprodukte *in vitro* mutiert. Die *in vitro*-Mutagenese ist trotz vieler verschiedener Verfahren ein aufwendiges Unterfangen. Durch die Synthesemöglichkeit ist das Einfügen beliebig vieler Mutationen auch an weit auseinanderliegenden Sequenzpositionen möglich, da die Sequenz frei definierbar und vorherbestimmbar ist. Es können also beliebig viele Varianten erzeugt werden.

Die freie Synthetisierbarkeit der DNA-Sequenzen wird viele der heute üblichen Methoden zeitaufwendiger DNA-Manipulationen aus dem Labor an die Synthesemaschine verlagern, wodurch eine große Kosten-, und damit verbunden eine große Zeitersparnis resultiert. Das vom Fachmann durchzuführende Experiment besteht dann aus dem Design einer Nucleinsäuresequenz an einem Computereditor und der
5 Überprüfung, ob sich die durch die Sequenzmanipulationen gewünschten Eigenschaften am biologischen Modell oder *in vitro* einstellen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit auch ein Beitrag zur Weiterentwicklung von Techniken der reversen Genetik.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nicht in das
10 bereitgestellte Nucleinsäuremolekül inkorporierte weitere Nucleinsäuremoleküle, Fragmente davon und/oder Nucleotide nach Schritt (2), (2a), (3), (4), (4a), (5) und/oder (5a) abgetrennt.

Die Abtrennung der nicht inkorporierten Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle ist zwar bevorzugt, aber nicht unbedingt notwendig und kann vom Fachmann nach Standardverfahren, z.B. durch
15 säulenchromatographische Verfahren bewerkstelligt werden. Die Konzentration an freien Nucleotidphosphaten könnte insbesondere für die Gesamtausbeute an gewünschter Nucleinsäure limitierend werden, verbrauchte Nucleotide die Synthese und Ligationsreaktion stören, die z.B. im Falle der Generierung von glatten Enden bzw. der Anlagerung von Nucleinsäure-Einzelsträngen an glatte Enden und nachfolgender Erzeugung des komplementären Stranges bei der Durchführung des
20 erfindungsgemäßen Verfahrens notwendig ist, wie vorstehend beschrieben wurde. Eine hohe Konzentration verschiedener Einzelstrang-DNAs erhöht das Risiko unerwünschter Nebenprodukte. Praktisch ist es deshalb von Vorteil, wenn jeder einzelne Syntheseschritt unter optimalen Bedingungen ablaufen kann. Somit empfiehlt sich eine Abtrennung der nicht benötigten Einzelstränge jeweils vor dem nächsten Syntheseschritt, beispielsweise in einer matrixgekoppelten Reaktion, nach deren Ablauf
25 verbrauchte Nucleotide und überschüssige Einzelstrang-Nucleinsäuren eluiert werden. Die Abtrennung kann somit selbstverständlich auch nach oder während der Durchführung des Schrittes (5) erfolgen.

Die vorstehend beschriebene optionale Ligation in der Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, die die Anlagerung über Hybridisierung komplementärer endständiger Nucleotide umfaßt,
30 kann beispielsweise vor, gleichzeitig mit oder nach Schritt (4) erfolgen. In einer anderen Ausführungsform kann sie nach oder während des Schrittes (5) erfolgen. Ein Beispiel für die Ligation nach Schritt (5) liefert der Fall, daß Bakterien, z.B. *E. coli*, mit dem nicht ligierten Syntheseprodukt transformiert werden und die Ligation durch endogene Ligasen vorgenommen wird. So ist bekannt, daß mit zunehmender Größe der komplementären Überlappung kohäsiver Enden eine Transformation beispielsweise von *E. coli* mit
35 geeigneter DNA unter Ausnutzung der endogenen Ligaseaktivität zur Zirkularisierung möglich ist. Dabei werden Lücken und überstehenden Einzelstrang-DNAs durchaus toleriert, da Reparaturmechanismen die Integrität des zirkulären Doppelstranges wieder herstellen. Einzelstrangbereiche werden aufgefüllt und repariert, wenn zumindest ein Phosphodiesterückgrat intakt ist. Vorzugsweise wird eine Ligation dann vorgenommen, wenn die Überhänge nur wenige Nucleotide lang sind. Im Falle längerer Überhänge ist
40 denkbar, daß zwischen den endständigen Nucleotiden des Einzel- und des Doppelstranges Lücken auftreten, die vor einer Ligationsreaktion beispielsweise durch eine Polymeraseaktivität geschlossen

werden. Da die bislang bekannten Restriktionsenzyme zumeist nur relativ kurze kohäsive Enden erzeugen, ist auch ein C und G bzw. A und T „tailing“ mit terminaler Transferase denkbar, das lange Überlappungsbereiche erzeugt, die ohne „*in vitro*“ Ligation direkt transformiert werden können. Schließlich kann das Syntheseprodukt auch nach Schritt der Isolierung des fertigen Syntheseproduktes einer Ligation zugeführt werden.

Wie bereits vorstehend erwähnt, wird in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die vorbestimmte Stelle des Nucleinsäuremoleküles durch Inkorporation eines artifiziellen oder modifizierten Nucleotids, eines Basenanalogs, einer chemischen Gruppe oder eines „mismatch“ in einer artifiziellen Haarnadelstruktur erzeugt wird, das/die/der mittels eines physikalischen, chemischen oder enzymatischen Verfahrens gespalten werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das artifizielle oder modifizierte Nucleotid 5-Hydroxy-2-desoxy-cytidin, 5-Hydroxy-2-desoxyuridin, oder 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin.

Wie bereits ebenfalls vorstehend erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem die Verknüpfung von zwei endständigen Nucleotiden über ein 3'-Hydroxy- und ein 5'-Phosphat-Ende mit Hilfe einer Ligaseaktivität, und die Anlagerung über die Hybridisierung komplementärer Sequenzen erfolgen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Nucleinsäure DNA. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Nucleinsäure RNA. Von dem erfindungsgemäßen Verfahren umfaßt ist auch die Generierung von DNA/RNA-Hybriden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Maskierung in Schritt (3) additiv und substraktiv durch Hinzufügung bzw. Entfernung einer chemischen Gruppe oder eines chemischen Moleküls. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Maskierung eines 5'-Endes durch das Entfernen der Phosphat-Gruppe(n) oder den Einbau eines 5'-modifizierten Nucleotids (z.B. Biotin-dNTP, Digoxigenin-dNTP etc.). Wie vorstehend erwähnt, wird durch eine Maskierung des 5'-Endes eines anzulagernden Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküles in der entsprechenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eine unerwünschte Ligasenebenreaktion zwischen den 5'- und 3'-Enden der Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle untereinander unterbunden und damit der möglichen Bildung von Konkaternen vorgebeugt, wodurch eine optimale Ausbeute des Verfahrens der erfindungsgemäßen Lehre gewährleistet wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Maskierung durch den Einbau mindestens eines 5'-modifizierten Nucleotids.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zeichnet sich, wie bereits erwähnt, ein maskiertes 3'-Ende durch das Vorhandensein eines Aminoblocks, eines Didesoxynucleotids, eines 3'-Phosphats, oder eines künstlichen 5'-Endes aus.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bildet das weitere Nucleinsäuremolekül an dem bereitgestellten Nucleinsäuremolekül nach Anlagerung und/ oder Verknüpfung entfernten Ende eine Haarnadelschleife aus, die als Primer für die Polymeraseaktivität dient.

- Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, wobei die Spaltung
10 an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (4) durch eine sequenzspezifisch spaltende tripelhelikale DNA erfolgt.

- Eine tripelhelikale DNA wird z.B. dann gebildet, wenn sich eine Einzelstrang-DNA, an deren Ende ein Schwermetall (SM) gekoppelt ist, an einen DNA-Doppelstrang anlagert und sich, sofern die
15 Sequenzbedingungen geeignet sind, eine tripelhelikale Struktur mit einem DNA-Doppelstrang ausbildet. Der Nucleinsäure-Doppelstrang wird von dem Schwermetall an einer definierten Position gespalten.

- Darüber hinaus kann wie bereits erwähnt, erfindungsgemäß jede spezifische physikalische, chemische und enzymatische Nucleinsäurespaltung eingesetzt werden, welche für die Anlagerung eines
20 Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküles zur nachfolgenden Ligation mit dem Nucleinsäure-Doppelstrangmolekül förderlich ist. Weitere Beispiele hierfür sind methodische Ansätze basierend auf designten Peptiden oder PNA (peptide nucleic acid). Eine Übersicht über die vorgenannten Moleküle und Beispiele für deren Einsatzmöglichkeiten kann der Fachmann der nachstehenden Literaturliste entnehmen.

- 25 Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren, bei dem die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (4) durch eine Typ II S Restriktionsendonuclease erfolgt. Typ oder Klasse II S Enzyme besitzen eine asymmetrische, also nichtpalindromische Erkennungssequenz. Die Spaltstellen liegen entweder 5'- oder 3'-distal zur Erkennungssequenz. Es werden entweder 5'- (z.B.
30 BspMI) oder 3'- (z.B. R1eAI) überstehenden Enden oder glatte Enden (z.B. BsmFI) erzeugt.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Typ II S Restriktionsendonuclease das R1eAI-Enzym aus *Rhizobium leguminosarum* (Vesely Z., Müller A, Schmitz G, Kaluza K, Jarsch M, Kessler C (1990) R1eAI : a novel class-IIIS restriction endonuclease from
35 *Rhizobium leguminosarum* recognizing 5'-CCCACA(N12/9) - 3', Gene 95: 129-131).

- In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist/sind das Nucleinsäure-Doppelstrangmoleküle und/oder die Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs, wobei für die Synthese der Einsatz synthetischer Einzelstrangmolekül
40 besonders bevorzugt ist.

Semisynthetische Moleküle sind dadurch herstellbar, daß Nucleinsäurefragmente aus „in vivo“ (Bakterien, Hefe) amplifizierter DNA (dsDNA, ssDNA) oder RNA in einem oder mehreren intermediären Schritten der erfindungsgemäßen Synthese an definierten Stellen durch Ligationsreaktionen eingebaut werden. Diese Strategie kann im Einzelfall Kosten beträchtlich reduzieren helfen. Beispielsweise kann das als

5 Startermolekül Nucleinsäuremolekül ebenfalls ein „in vivo“ erzeugtes DNA-Molekül sein, an das durch rekursive DNA-Synthese beliebige DNA-Sequenzen angehängt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Synthese zumindest teilweise automatisiert. So kann beispielsweise in einem Nucleinsäure (Gen-) syntheseautomaten für Nucleinsäure-Doppelstränge aus Nucleinsäure-Einzelsträngen eine Batterie von

10 automatisierten chemischen Oligonucleotidsynthesen (eine bereits in großem Ausmaße praktizierte Technologie) den Rohstoff für die Synthese von biologisch aktiven, doppelsträngigen DNA-Molekülen (z.B. ganzen Genen) liefern. Diese werden aus den chemisch synthetisierten Oligonucleotiden in einem ebenfalls automatisierten Verfahren hergestellt.

15 Dabei sind in einer Synthesekammer die zu verlängernden Doppelstrangnucleinsäuren an der Synthesematrix gebunden. In dieser Synthesekammer laufen in einer zyklischen Reaktionsfolge immer wieder die gleichen oben beschriebenen Schritte ab. Die Reaktionsnebenprodukte der vorhergehenden Reaktion werden vor Beginn einer neuen Reaktion aus der Synthesekammer ausgewaschen. Das um ein

20 Nucleinsäuremolekül verlängerte Startermolekül bleibt an die Synthesematrix gebunden. Bei jedem Syntheseschritt wird eine Nucleinsäure mit einer anderen Sequenzfolge eingebaut, so daß schlußendlich eine gegebenenfalls doppelsträngige Nucleinsäure mit der gewünschten Nucleotidsequenz entsteht.

Die Erfindung betrifft in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren, bei dem die

25 Synthese matrixgebunden durchgeführt wird.

Alle Trägermaterialien, an die sich eine Nucleinsäure binden lassen und deren Eigenschaften mit der angestrebten rekursiven Nucleinsäure-Synthese kompatibel sind, kommen als Synthesematrix in Frage, z.B. streptavidinbemannte Oberflächen, wobei das als Startermolekül eingesetzte Nucleinsäure-

30 Doppelstrangmolekül über ein eingebautes biotinyliertes Nucleotid an die Synthesematrix gekoppelt wird. Weitere bevorzugte Synthesematrices schließen Nylonoberflächen, an die polydT-haltige Sequenzen durch UV-Bestrahlung gekoppelt werden, sowie tosyl-, aktivester- oder epoxidaktivierte Oberflächen (z.B. GOPS) ein, wobei die Bindung vorzugsweise über einen „Aminolink“ erfolgt, wie Glas (CPG, Glaswolle etc.), Silikat, Latex, Polystyrol, Epoxid oder Silizium.

35 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das synthetisierte Nucleinsäuremolekül nach der Synthese isoliert.

Dies geschieht einerseits durch Einbau eines affinitätsvermittelnden Agens im letzten Syntheseschritt, wie z.B. Biotin, Digoxiginin, eines Histidin-Tags oder eines Maltoserestes. Die so markierten

40

Syntheseendprodukte können somit einfach und kostengünstig mittels entsprechender Säulen isoliert werden.

Alternativ wird im letzten Syntheseschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Plasmid mit dem
5 Syntheseprodukt verknüpft und das dadurch entstehende Nucleinsäuremolekül, gegebenenfalls nach
dessen Rezirkularisierung in Bakterien eingeführt und vervielfältigt. Alternativ werden in das
bereitgestellte Nucleinsäuremolekül sowie in das im letzten Syntheseschritt verwendete
Nucleinsäuremolekül definierte Sequenzen inkorporiert, an die Primer spezifisch binden können. Mit Hilfe
dieser Primer kann das fertig synthetisierte Nucleinsäuremolekül in einer PCR-Reaktion amplifiziert
10 werden, wodurch das Syntheseprodukt von der Affinitätsmatrix isoliert wird. Finden sich in den terminalen
Sequenzen Sequenzmotive (z.B. TyplIS Erkennungsstellen), mittels derer kohäsive Enden erzeugt
werden können, so ist es leicht möglich, aus einzelnen DNA-Molekülen solche von noch höherer
Ordnung zu synthetisieren.

15 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
Nucleinsäure-Einzelstrangmoleküle durch Denaturierung des Nucleinsäure-Doppelstrangmoleküls isoliert.

Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dazu geeignet, Nucleinsäure-
Einzelstrangmoleküle beliebiger Zusammensetzung herzustellen. In diesem Zusammenhang besonders
20 zu erwähnen ist die Möglichkeit, derartige RNA-Moleküle bereitzustellen.

Schließlich betrifft die Erfindung einen Kit, umfassend:

- (a) eine Ligase, und/oder
- (b) eine Polymerase,
- 25 (c) ggfs. ein Typ II S-Restriktionsenzym,
- (d) ggfs. eine Uracil-DNA-Glycosylase und eine Apyrimidase und/oder eine Endonuclease III und eine
Formamidopyrimidin DNA Glycosylase und/ oder ein "mismatch repair" Enzym,
- (e) gegebenenfalls eine Phosphatase, eine terminale Transferase und/ oder eine Exonuklease,
- (f) gegebenenfalls einen Waschpuffer zur Elution von Reaktionsnebenprodukten und nicht in das
30 Produkt der erfindungsgemäßen Synthese eingebautem Material,
- (g) gegebenenfalls eine Synthesematrix mit einem gegebenenfalls bereits daran gebundenen
Nucleinsäuremolekül als Startermolekül,
- (h) gegebenenfalls geeignete Reaktionspuffer für die in (a) bis (e) aufgeführten Enzyme.

35 Aufgrund der Lehre der vorliegenden Erfindung sowie aufgrund des allgemeinen Fachwissens in diesem
technischen Gebiet ist dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits bekannt, wie er die einzelnen
Komponenten des Kits, z.B. die Puffer, herstellt und formuliert. Gegebenenfalls kann der
erfindungsgemäße Kit auch ein nicht an eine Matrix gebundenes Startermolekül und/ oder einen Satz
geeigneter Einzelstrangmoleküle enthalten.

Beschreibung der Figuren

Figur 1. „In vitro“-ssDNA-Synthese in 3'-5'-Richtung (1) Ein an eine Matrix gekoppeltes Startermolekül (n) wird mittels einer Ligaseaktivität um ein n+1tes Einzelstrangmolekül durch eine 3'-5' Phosphodiesterbindung verknüpft. Die n+1te ssDNA besitzt terminal ein Uracildesoxynukleotid. Die glycosidische Bindung der Base Uracil wird durch die DNA-Uracilglycosylase gespalten, wodurch eine apyrimidinische Position entsteht. Diese wiederum wird durch eine apyrimidinische Endonukleaseaktivität (ExonukleaseIII) so gespalten, daß ein 5'-Phosphat und ein 3'-OH ende entsteht. (3) an das freiwerdende 5'-Phosphatende wird in der n+2ten Ligationsschritt das n+2te ssDNA-Molekül verknüpft. Eine anschließende Phosphatesereaktion (nicht gezeigt, s. Figur 4.) inaktiviert alle DNA-Ketten für den n+3ten Ligationsschritt für alle folgenden Ligationsschritte, sofern kein n+2tes ssDNA-Molekül im n+2ten Schritt eingebaut wurde. Durch die DNA-Uracilglycosylase und die apyrimidinische Endonukleaseaktivität kann durch Prozessierung wieder ein 5'-Phosphat für die nächste Reaktionsfolge (n+3) zur Verfügung gestellt werden. Alle Schritte wiederholen sich k-mal bis das letzte ssDNA-Molekül im m-ten Schritt eingebaut wurde.

Figur 2. „In vitro“ - dsDNA-Synthese in 3'-5'-Richtung. Alle Schritte erfolgen wie in Figur 1., dann aber wird im letzten Schritt ausgehend vom 3'-Ende des Startermoleküls eine Polymerisationsreaktion gestartet, die den neu synthetisierten Einzelstrang zum Doppelstrang auffüllt. Alternativ kann im ersten und im letzten Schritt jeweils ein Primer eines Primerpaares eingebaut werden und somit ein Doppelstrangmolekül durch Amplifikation mittels der PCR-Reaktion erzeugt werden.

Figur 3. „In vitro“ - dsDNA-Synthese in 3'-5'-Richtung. Alle Schritte erfolgen wie in Figur 1.. Innerhalb eines jeden Synthesesyklus wird nach der Phosphatasebehandlung ein Polymerisationsschritt eingeleitet, der die anligierte ssDNA in eine dsDNA umwandelt. Die Prozessierung kann auch mittels einer Restriktionsendonuklease des Typs IIS erfolgen, sofern eine Erkennungssequenz in jedem der ssDNA-Fragmente eingebaut vorliegt.

Figure 4. „In vitro“ - dsDNA-Synthese in 3'-5'-Richtung. Alle Schritte erfolgen wie in Figur 1. Eine nach einem Ligationsschritt durchgeführte Phosphatesereaktion inaktiviert alle DNA-Moleküle für den nächsten Ligationsschritt und für alle folgenden Ligationsschritte, sofern kein ssDNA-Molekül im n-ten Synthesesyklus eingebaut wurde. Durch die DNA-Uracilglycosylase und die apyrimidinische Endonukleaseaktivität in jedem Synthesesyklus kann durch Prozessierung wieder ein 5'-Phosphat für die nächste Reaktionsfolge zur Verfügung gestellt werden. Alle Schritte wiederholen sich k-mal bis das letzte ssDNA-Molekül im m-ten Schritt eingebaut wurde.

Figur 5. „In vitro“-ssDNA-Synthese in 5'-3'-Richtung (1) Ein an eine Matrix gekoppeltes Startermolekül (n) wird mittels einer Ligaseaktivität um ein n+1tes Einzelstrangmolekül durch eine 3'-5' Phosphodiesterbindung verknüpft. Die n+1te ssDNA besitzt terminal ein Uracildesoxynukleotid, ist 5'-phosphoryliert und 3'-blockiert (-X). Die glycosidische Bindung der Base Uracil wird durch die DNA-Uracilglycosylase gespalten, wodurch eine apyrimidinische Position entsteht. Diese wiederum wird durch eine apyrimidinische Endonukleaseaktivität (ExonukleaseIII) so gespalten, daß ein 5'-Phosphat und ein 3'-OH ende entsteht. (3) an das freiwerdende 5'-Phosphatende wird in der n+2ten Ligationsschritt das n+2te ssDNA-Molekül verknüpft. Eine anschließende terminale Transferasereaktion mit einem Didesoxytrinukleotid (nicht gezeigt, s. Figur 7.) inaktiviert alle DNA-Ketten für den n+3ten Ligationsschritt für alle folgenden Ligationsschritte, sofern kein n+2tes ssDNA-Molekül im n+2ten Schritt eingebaut wurde. Durch die DNA-Uracilglycosylase und die apyrimidinische Endonukleaseaktivität kann durch Prozessierung wieder ein 3'-OH für die nächste Reaktionsfolge (n+3) zur Verfügung gestellt werden. Alle Schritte wiederholen sich k-mal bis das letzte ssDNA-Molekül im m-ten Schritt eingebaut wurde.

Figur 6. „In vitro“-ssDNA-Synthese in 5'-3'-Richtung (1) Ein an eine Matrix gekoppeltes Startermolekül (n) wird mittels einer Ligaseaktivität um ein n+1tes Einzelstrangmolekül durch eine 3'-5' Phosphodiesterbindung verknüpft. Alle weiteren Schritte erfolgen wie in Figur 5. dargestellt. Im letzten Schritt kann, initiiert durch beispielsweise eine 3'-terminale Haarnadelstruktur ein 3'-Ende für eine DNA-Polymerisationsreaktion zur Verfügung gestellt werden oder eine dsDNA Polymerisation erfolgt wie in Figur 2 beschrieben.

Figur 7. „In vitro“-ssDNA-Synthese in 5'-3'-Richtung (1), Darstellung der Reaktion zur Inaktivierung nicht ligierter Enden. Eine terminale Transferasereaktion mit einem Didesoxytrinukleotid inaktiviert alle DNA-Ketten für den nächsten Ligationsschritt für alle jeweils folgenden Ligationsschritte, sofern kein ssDNA-Molekül im n-ten Syntheseschritt eingebaut wurde. Durch die DNA-Uracilglycosylase und die apyrimidinische Endonukleaseaktivität kann durch Prozessierung wieder ein 3'-OH für die nächste Reaktionsfolge zur Verfügung gestellt werden. Alle Schritte wiederholen sich k-mal bis das letzte ssDNA-Molekül im m-ten Schritt eingebaut wurde.

Figur 8. Polymerase-basierte DNA-Synthese. Ein Startermolekül (n) wird zur Verfügung gestellt. Synthetische Oligonukleotide werden sequentiell in einer zyklischen Reaktionsfolge zur Verfügung gestellt, wobei deren 5'-Ende zur Hybridisierung mit dem jeweils vorhergehenden 3'-Ende des komplementären DNA-Stranges gebracht wird. Vom 3'-Ende ausgehend erfolgt die Synthese zum Doppelstrang. Fig. 8A zeigt eine vollständige Degradation des Template-Moleküls mit T7 (Gen6), während in Fig. 8B eine partielle Degradation mit Exonuklease III dargestellt ist.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

- 5 Die rekursive DNA-Synthese „in vitro“ kann für Manipulation von DNA - Sequenzen „in vitro“ eingesetzt werden. Zum einen können Genmutationen, wie Deletionsmutagenesen, auch mehrere Deletionen in einem Gen gleichzeitig, Genfusionen unter Erzeugung neuer Eigenschaften, Insertionsmutagenesen, Substitutionmutagenesen und auch Sequenzinversionen durchgeführt werden. Des weiteren lassen sich eine bis beliebig viele Punktmutationen in eine Sequenz einführen. Alle DNA-Sequenzen können ohne
10 Zwischenclonierungsschritte in parallelen Synthesen direkt erzeugt werden.

- Die durch die Sequenzmanipulationen resultierenden funktionalen Veränderungen der biologischen Aktivität „in vivo“ können sich zum einen auf der Proteinebene auswirken, sofern die codierenden Sequenzen in funktionale Proteine translatiert werden können. Die Methode kann somit zur Umsetzung
15 von Überlegungen bei Enzym- bzw. Proteindesign eingesetzt werden.

- Zum anderen aber ist es möglich, die DNA-Sequenzen regulatorischer cis-Elemente zu manipulieren, um die Bindungsaktivität von Transaktivatoren und Suppresoren zu verändern, deren Verhalten zu untersuchen oder gar ganz neue Kombinationen von cis-Elementen zu schaffen. Weiterhin könnte auch
20 die Aktivität von RNA-Molekülen manipuliert werden (z.B. Ribozyme), sofern die manipulierte DNA transkribiert wird.

- Das folgende Beispiel für die Anwendung der rekursiven DNA - „in vitro“ - Synthesemethode ist die Manipulation von DNA-Sequenzen zur Analyse der Bindungsaktivität eines transaktiven
25 Regulatorproteins an einer bakteriellen Promotorregion. Durch die „in vitro“ - Mutagenese der Bindungsstellen werden die Auswirkungen auf das DNA-bindende Protein untersucht. Die DNA-Wildtypsequenz und die Mutanten des cis-aktiven Elementes sind in der Figur 7 dargestellt, die Sequenzmanipulationen sind im Text erläutert. Ziel der Versuche war es, die Funktionalität der Bindung des Regulators in einem anderen Sequenzkontext „in vitro“ und eventuell auch „in vivo“ untersuchen zu
30 können.

- Auf einem SauIIIA-DNA-Fragment im Bereich eines bakteriellen Promotors finden sich palindromische Sequenzabschnitte, deren Struktur starke Ähnlichkeit mit Sequenzen besitzen, die auch in anderen Systemen an der transkriptionellen Regulation beteiligt sind. Die transkriptionelle Aktivität des im 5'-
35 Sequenzbereich des 6-HDNO-Gens befindlichen S⁷⁰-ähnlichen Promotors, auf dem cis-aktive Elemente liegen, wurde von Mauch et al., (1990) „in vivo“ im heterologen *E. coli* System detailliert untersucht. Die Clonierung dieses DNA-Fragments, das in den meisten DNA-Bindungsstudien dieser Arbeit Verwendung fand, wird im folgenden als WT-6-HDNO-Promotorfragment bezeichnet (Fig. 7A (1-3)).

- 40 Die Inkubation von Rohextrakten aus *Arthrobacter nicotinovorans* Zellen (10-40 mg Gesamtprotein) mit einem radioaktiv markierten 6-HDNO-Bindungsfragment des 6-HDNO-Gens bei Anwesenheit eines

Kompetitors (i.d.R. polydIdC), aus dem Promotorbereich, zeigt nach der Trennung der Bestandteile dieses Inkubationsansatzes im elektrischen Feld eines nativen PAA-Gels eine deutliche Retention des DNA-Fragments gegenüber einem Kontrollansatz ohne Zugabe von Rohextraktprotein.

- 5 Der zur Identifikation der NicR1-Bindeaktivität herangezogene experimentelle Ansatz wird als Gelretentionsanalyse bezeichnet. Mit Hilfe dieser Methode kann das kinetische und funktionale Verhalten von DNA-Bindungsproteinen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern „in vitro“ qualitativ und quantitativ untersucht werden. Außerdem kann man unter bestimmten Voraussetzungen auch Aussagen zur Struktur des DNA/ Protein-Komplexes machen.

10

Unter Verwendung von Rohextrakten kann man in der Regel im Gelretentionsexperiment eine dominante, retardierte Bande erkennen. Eine zweite Bande ist manchmal ebenfalls erkennbar. Diese DNA-Bindungsaktivität konnte durch große Mengen von unmarkierter, unspezifischer Kompetitor-DNA nicht supprimiert werden, wohl aber durch unmarkiertes Bindefragment in sehr geringen Mengen. Es wurde
15 deshalb angenommen, daß diese DNA-Bindeaktivität spezifisch ist und mit der transkriptionellen Regulation des Nikotinregulons in Zusammenhang steht. Sie wurde mit dem Kürzel NicR1 (nicotine regulator 1) bezeichnet (Mauch et al., Bernauer et al., 1992).

- Das Verhalten der nicR1-Bindeaktivität im Gelretentionsexperiment wurde in dieser Arbeit analysiert um
20 Aussagen über den Ort, die Spezifität, Kinetik und Stöchiometrie der Bindungsreaktion treffen zu können und die Reaktion der DNA-Bindungsfunktion auf Manipulationen an dem WT-6-HDNO-Promotorfragment und auf potentielle Effektorsubstanzen zu untersuchen.

- Diese Versuche sollten darüber Aufschluß geben, welche molekularen Mechanismen für die Regulation
25 des 6-HDNO-Gens verantwortlich sein könnten. Außerdem wurden die Anzuchtbedingungen und der Induktionsstatus der *Arthrobacter nicotinovorans* Zellen variiert, aus denen schließlich Rohextrakt zur Analyse im Gelretentionsexperiment hergestellt wurde. Diese Experimente sollten Aufschluß darüber geben, ob sich das Bindungsverhalten von NicR1 verändert oder die Anwesenheit zusätzlicher Faktoren in Abhängigkeit von einem der Versuchsparameter nachzuweisen ist. Der zu den Protein/DNA-
30 Bindungsversuchen verwendete Reaktionsstandardpuffer lehnt sich an den von Garner und Revzin (1981) verwendeten Reaktionspuffer an. Die NicR1-Bindungsaktivität ist durch Ammoniumsulfatfraktionierung anreicherbar. Die Anreicherung der NicR1-Bindungsaktivität war die Voraussetzung für Versuche zur Analyse des Bindungsverhaltens von NicR1 bei gleichzeitiger Bindung von beiden palindromischen Sequenzen, die auf dem WT-6-HDNO-Promotorfragment zu finden sind.

35

- Das WT-6-HDNO-Promotorfragment aus dem 5'-Kontrollbereich des 6-HDNO-Gens besitzt einige sehr interessante Sequenzmerkmale (s. Fig. 7). Es ist von ausgedehnten invertierten Sequenzwiederholungen (IR) und anderen auffälligen Sequenzmotiven geprägt. Charakteristische Sequenzarrangements innerhalb der 6-HDNO-Gen-promoterregion sind in Fig. 7 gezeigt. Dies zeigt zwei invertierte
40 Wiederholungen, IR1 und IR2, welche extensive Homologien untereinander haben (Fig. 7). Die rechte

palindromische Halbseite von IR2 wiederholt sich im 5'-Bereich noch einmal. Solche Palindrome sind strukturelle Merkmale, die man in vielen bakteriellen cis-aktiven Regulatorregionen findet.

- IR1 und IR2 sind durch eine 50 bp lange interpalindromische Sequenz voneinander getrennt. Die palindromischen Halbseiten von IR1 sind über 17 bp zueinander homolog, die von IR2 über 9 bp. Das Palindrom von IR1 erreicht eine um zwölf Basenpaare größere Ausdehnung, zeigt aber in diesem Bereich zwei Insertionen von je zwei und einem Basenpaar (AT, A). Zehn von zwölf Basenpaaren von IR1 in der 5'-Hälfte und 9 von 12 Basenpaaren in der 3'-Hälfte der Sequenz sind zu IR2 homolog (Fig. 7A, Sequenzen von IR1 und IR2). Diese sequenzspezifischen Merkmale könnten strukturelle und funktionale Bedeutung bei der Bindung des „in trans“-bindungsaktiven Proteins NicR1 und einer S⁷⁰-ähnlichen RNA-Polymerase besitzen. IR1 repräsentiert eine nahezu perfekte S⁷⁰-ähnliche Promotorsequenz, mit einer bemerkenswerten Modifikation. Die -10-Region unterscheidet sich von der Konsensussequenz TAT AAT durch die Insertion eines C, wodurch die Sequenz TAT-CAAT entsteht. In der Sequenz von IR2 findet man eine -30-Region, aber keine Ähnlichkeit zu der bekannten -10-Region einer S⁷⁰-ähnlichen Promotorsequenz. Der Abstand der -10 und -30-Region entspricht mit 16 bp dem S⁷⁰-Ideal von 17. Integriert in die Sequenz von IR2 ist die -35-Region eines S⁷⁰-ähnlichen Promotors, eine konsensusähnliche -10-Region fehlt. Einige andere Sequenzmerkmale könnten auch die Aktivität weiterer am 5'-Sequenzbereich des 6-HDNO-Gens transaktiver regulatorischer Elemente widerspiegeln. Innerhalb der Palindrome IR1 und IR2 befinden sich drei N1al-(CATG)-Erkennungspalindrome an homologer Position. Interessant ist, daß sich hinter der linken palindromischen Halbseite von IR2, an nicht homologer Position, ebenfalls eine solche Schnittstelle befindet. Es stellt sich die Frage von Zufall oder Notwendigkeit einer solchen Struktur. Außerhalb der palindromischen Sequenzen von IR1 und IR2 befinden sich ebenfalls auffallende Sequenzmotive. GC- und AT-reiche Sequenzen sind alternierend angeordnet. Ein interessantes Sequenzmerkmal dieser Domäne ist die Gegenwart GC reicher Sequenzabschnitte, welche von einem AT-reichen Sequenzabschnitt in der 6-HDNO-5'-Sequenz unterbrochen werden. Die GC-Sequenzblöcke sind oberhalb der 5'-Region des S⁷⁰-ähnlichen Promotors lokalisiert. Eine detaillierte Basennachbarschaftsanalyse nach dem in Ebbole und Zalkin (1989) beschriebenen Algorithmus zeigt, daß diese Sequenz in hohem Maße nicht statistisch ist. Um dies zu zeigen, wurde eigens ein Computerprogramm in „Pascal“ geschrieben. Während die Sequenzen innerhalb der palindromischen Bereiche aus ziemlich regelmäßig alternierenden kurzen GC- und AT-Bereichen mit sehr ausgewogenem GC-Gehalt bestehen, finden sich 5' zu den Palindromen größere Sequenzabschnitte mit sehr unausgewogenem GC-Gehalt (Fig. 7A). Zunächst steigt der GC-Gehalt von 5' außerhalb des Palindroms IR2 kommend an, es wird zunächst ein GC-Maximum, dann ein GC-Minimum durchlaufen (Fig. 7A). Die Situation wiederholt sich vor dem Palindrom IR1. Alternierende GC- und AT-reiche Sequenzabschnitte werden mit strukturellen Eigenschaften der Proteinbindung in Zusammenhang gebracht. Die AT-reichen Positionen drehen sich mit ihrer kleinen DNA-Furche in das Protein, die GC-reichen Sequenzblöcke zeigen nach außen. GC-reiche Promotoren, welche mit den bekannten S⁷⁰-ähnlichen Promotoren keine Sequenzähnlichkeit mehr besitzen, finden sich in *Streptomyces* Spezies.

- Als Startermolekül (s. Fig. 7AA(0)) für die rekursive DNA-Synthese wurde das Plasmid pUC19 (Yanish-Perron et.al., 1985) mit BamHI und KpnI doppelverdaut und über ein Agarosegel gereinigt. KpnI hat die Erkennungssequenz 5'-GGTAC'C-3'. An das 3'-überstehende KpnI-Ende wurde ein Oligonukleotid komplementärer Sequenz in Anwesenheit einer T4-Ligase, T4-DNA-Polymerase und 0,2 mM dNTP unter
- 5 Standardbedingungen (Sambrook et al., (1989)) angelagert, ligiert und zum Doppelstrang aufgefüllt. Das Oligonukleotid besitzt am 5'-Ende die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuclease RleAI plus einige zusätzliche Basen (s. Fig. 7A(1)). Das nun doppelsträngige DNA-Molekül (aufgefülltes überstehendes synthetisches Oligonukleotid) wurde mit einer Anreicherungsfraktion der Restriktionsendonuclease RleAI aus *Rhizobium leguminosarum* restringiert (jeweils Fig. 7 (2) und (3')).
- 10 Die Reaktionsbedingungen wurden aus Veseley et al., (1990) entnommen. Dieses Enzym erzeugt 3'-überstehende Enden außerhalb seiner asymmetrischen Bindungsstelle. Diese Spezifität ist bislang einzigartig und läßt die wiederholte Anlagerung eines Oligonucleotides und das Priming für eine DNA-Polymerisation zu. Das kurze DNA-Fragment mit der RleAI-Erkennungssequenz wurde vom Plasmid über ein Agarosegel weggereinigt. An das bei der Restriktionsreaktion entstehende 3'-überstehende Ende
- 15 wurde erneut ein zu dessen Ende komplementäres Oligonucleotid (Fig. 7A(2)) angelagert und aufgefüllt, wie oben erwähnt (s. auch Fig. 1 und 2). Die gleiche Reaktion wurde mit dem Oligonucleotid (Fig. 7A(3)) und den Varianten Fig. 7B-1 bis B-7 durchgeführt. Durch die Verwendung von synthetischen Oligonucleotiden konnten parallel sieben Sequenzvarianten und die Wildtypsequenz erzeugt werden. Nach der Reaktionsfolge Fig. 7A (3) wurden die neu entstandenen DNAs mit BamHI nachgespalten (s.
- 20 Sequenz, Fig. 7A(3')), der Vektor (pUC19 + Bindefragment) zirkularisiert und gemäß Standardmethoden in *E. coli* transformiert. Findet sich die RleAI-Erkennungssequenz terminal am Ende auch der synthetischen Oligonucleotide, kann man die DNA-Synthesereaktion wie in diesem Beispiel jeweils um einen Schritt verlängern.
- 25 Um die Bindungseigenschaften von NicR1 zu charakterisieren, wurden Sequenzänderungen in die den S⁷⁰-ähnlichen Promotor tragende IR1-Bindungsstelle eingeführt und die Länge der interpalindromische Sequenz (IS, Fig. 7B-5, -6, -7) wurde variiert. Durch letzere Versuche sollten die sterischen Anforderungen an die palindromische Bindungssequenz IR1 untersucht werden. Sequenzmodifikationen, welche in das WT-6-HDNO-Promotorfragment eingeführt wurden, sind in der Figur 7 gezeigt.
- 30 Die Änderungen, die durch „rekursive DNA Synthese in vitro“ in der Sequenz des Promotor enthaltenden IR1-Palindroms und in der interpalindromischen Sequenz eingeführt wurden, sind in Fig. 7B dargestellt. Die Reduktion von IR1 auf ein Oktamer (Fig. 7B-3) wie auch die Deletion der zentralen G-Position (Fig. 7B-4) zerstören die Bindungsfähigkeit von NicR1 an IR1.
- 35 Setzt man die Spaltungsprodukte im Gelretentionsexperiment ein, so wird nur IR2 retardiert, nicht aber das mutierte IR1 enthaltende Fragment. Das in Fig. 7B-4 gezeigt Konstrukt zeigt Retention nur noch durch die Bindung von NicR1 an IR2. Da die Größe des Komplexes an IR2 die gleiche Größe hat wie der Komplex an IR1, ist dies ein Hinweis auf die Bindung desselben Proteins an beide Palindrome.

Entgegen dem ausgeprägten Effekt, der durch die Änderungen sowohl der Länge wie auch der Symmetrie des Palindroms IR1 auf die NicR1-Bindung erzeugt wird, führten Änderungen der Anzahl an Helixwindungen in der interpalindromischen Sequenz zu keinem Unterschied der NicR1-Bindung an beide Palindrome. Die Länge der interpalindromischen Sequenz wurde durch Deletionen wie auch
 5 Insertionen von je 5bp (Fig. 7B-6 und -7) verändert. Diese Änderungen entsprechen je einer halben Helixwindung. Als Konsequenz ergibt sich daraus, daß sich in diesen DNA-Mutanten die IR2-Bindungsstelle relativ zu der IR1-Bindungsstelle um 180° verdreht befindet. Zusätzlich wurde die 50 bp lange interpalindromische Sequenz um 20 bp reduziert (Fig. 7B-5). Das Muster des Gelretentionsexperiments, welches diese Änderungen trägt (Fig. 7B-5, -6, -7), war identisch mit dem
 10 Kontrollmuster, das mit dem unveränderten 242 bp langen 6-HDNO-Promotorfragment (Fig. 7B-1) zu sehen war.

Die rechte Hälfte von IR1 enthält die -10 Region des Promotors des 6-HDNO-Gens die sich von der Konsensussequenz des Promotors der S⁷⁰ RNA-Polymerasen durch die Insertion einer Cytosin
 15 enthaltenden, zusätzlichen Basenposition in der TATAAT-Sequenz unterscheidet (Fig. 7B-1). Es stellte sich die Frage, ob diese ungewöhnliche S⁷⁰ -10-Region an der Spezifität der NicR1-Bindung an IR1 Anteil hat. Im Gelretentionsexperiment (Fig. 7B-2) mit NicR1 zeigte die Deletion des Cytosinrestes an der entsprechenden Position (Fig. 7B-2) keine Änderung des Proteinbindungsmusters, verglichen mit dem Muster, das mit dem unveränderten DNA-Fragment erhalten wurde, wohl aber bei der Bindung der S⁷⁰
 20 -ähnlichen RNA-Polymerase von *E. coli*.

Die Aussage, daß die beiden Mutationen Fig. 7B-3 und -4 die NicR1-Bindefähigkeit an das Palindrom IR1 stark verringern, wenn nicht sogar ganz verhindern, wird durch weitere, hier nicht beschriebene
 25 Versuche untermauert.

Beispiel 2

30 Beispiel für die Synthese des :

PLASMIDS π -AN7 885 bp : Huang, Little, Seed (1985) in :
 Vectors: A survey of molecular cloning and their applications,
 Rodriguez, R., ed., Butterworth Publishers, Stoneham, MA, USA.

STARTERMOLEKÜL :

AAUGCGGCCGCTCACGACCGCGCGGTTAATTAACGAGAAATCCGCGGTGCAATTAATT-X

Restriktionsenzyme : EagI, Bst2BI, AccBSI, NotI, PacI, XhoI, EcoRI, SacI

B=Biotin

X=AminoBlock

10 π -AN7- SEQUENCE : Source : GeneBank

POSITION 3 : Uracil

01 AAUTTTCGGACTTTTGAAAGTGATGGTGGTGGGGGAAGGATTCGAACCTTCGAAGTCGATGAC3'

15 02 AAUGGCAGATTAGAGTCTGCTCCCTTTGGCCGCTCGGGAACCCACACGGGTAATGCTTTT3'

03 AAUACTGGCCTGCTCCCTTATCGGGAAGCGGGGCGCATCATATCAATGACGCGCCGCTGTAA3'

04 AAUAGTGTTACGTTGAGAAAGATTCCCGGGATCCGTCGACCTGCAGATCTCTAGAAGCT3'

05 AAUCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT-3'

20 06 AAUCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA-3'

07 AAUGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC-3'

08 AAUTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT-3'

09 AAUAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCG-3'

25 010 AAUCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG-3'

011 AAUCAGCAGCCACTGCTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGGTGCTACAGAGTTCT-3'

012 AAUTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC-3'

30 013 AAUTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG-3'

014 AAUCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC-3'

015 AAUAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAAATTC-3'

LETZTER SYNTHESZYKL US :

B=Biotin-AAUCTCGAGAATTCCGCGGTGCAATTAATTAAAAAAAAAAAAAA

5

Underscore : SupF
BlueSequence :Polylinker
BlackSequence :ColEI

Kurzprotokoll :

10

Ein µg biotinyliertes Startermolekül wurde an streptavidincoated DynalBeads gebunden. Dann wurde 0.2 mM Biotin-desoxyUracil eingestellt (je 0.5 h Inkubation bei RT), um alle Biotin Bindungsstellen zu blockieren.

15

In 16 Syntheszyklen (Ligation, T4-RNA-Ligase; Uracil-DNA-Glycosylase, ExonukleaseIII; Phosphatase) wurden die 17 DNA-Moleküle zu einer einzelsträngigen, die ganze Plasmidsequenz umfassende DNA verknüpft.

Vom 3'-Ende des Startermolekül her wurde mittels der T4-DNA-Polymerase die ssDNA zur dsDNA aufgefüllt. Mit NotI wurde die dsDNA von Ihrer Bindung an die DynalBeads befreit.

Die gleiche Menge frischer DynalBeads wurden zugegeben.

20

Nur die Moleküle mit Biotin wurden an die Säule gebunden. Moleküle ohne Biotin aus der letzten Ligrationsreaktion wurden gewaschen.

Mit der RestriktionsendonukleasePacI wurde nachgespalten.

Die Dynabeads wurden mit einem Magneten pelletiert.

Aus dem Überstand wurden die Moleküle mit Ethanol gefällt und das Molekül mit der T4-DNA-Ligase zirkularisiert.

25

Die zirkularisierten synthetischen Plasmidmoleküle wurden dann in E. coli DH10α/ P3 transformiert nach Standardprotokoll und gegen Tet/ Amp auf LB-Platten selektioniert.

Literaturliste

- 5 Bernauer, H., Mauch, L. and Brandisch, R. (1992) Interaction of the regularory protein NicR1 with the promotor region of the pAO1-encoded 6-hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter oxidans*, *Mol Microbiol* 6: 1809-1820.
- 10 Bigey, P., G. Pratviel, et al. (1995). "Cleavage of double-stranded DNA by 'metalloporphyrin-linker-oligonucleotide' molecules: influence of the linker. *Nucleic Acids Res* 23(19): 3894-900.
- 15 Francois, J. C. and C. Helene (1995). "Recognition and cleavage of single-stranded DNA containing hairpin structures by oligonucleotides forming both Watson-Crick and Hoogsteen hydrogen bonds. *Biochemistry* 34(1): 65-72.
- 20 Gao, X., A. Stassinopoulos, et al. (1995). "Structural basis for the sequence-specific DNA strand cleavage by the ene-diyne neocarzinostatin chromophore. Structure of the post-activated chromophore-DNA complex. *Biochemistry* 34(1): 40-9.
- 25 Garner, M.M., and Revzin, A. (1981) A gel elektrophoresis method for quantifiying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *E. coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 9:3047-3060.
- 30 Harford, C., S. Narindrasorasak, et al. (1996). "The designed protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138-211) specifically cleaves the AP-1 binding site containing DNA. *Biochemistry* 35(14): 4271-8.
- 35 Kane, S. A., S. M. Hecht, et al. (1995). "Specific cleavage of a DNA triple helix by FeII-bleomycin. *Biochemistry* 34(51): 16715-24.

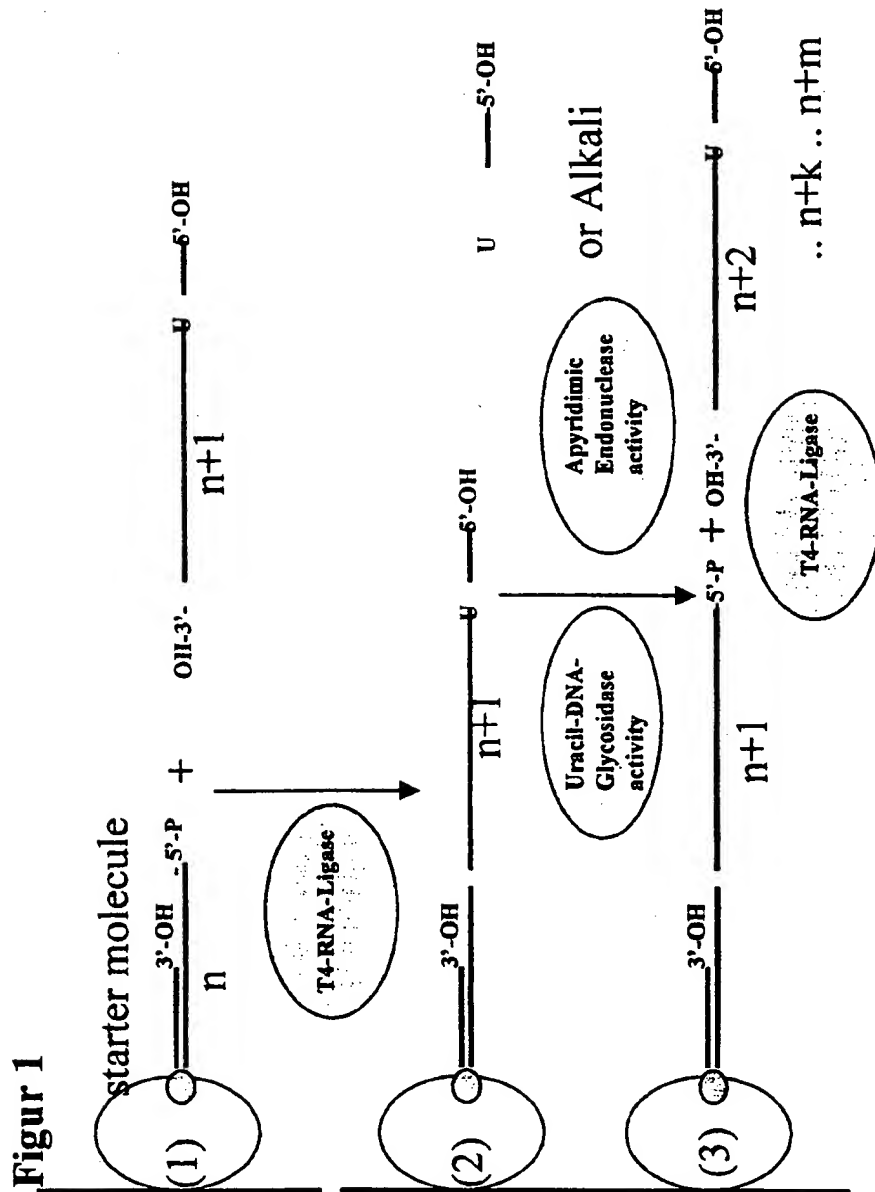
- Mauch L., Bichler V., and Brandisch R (1990) Funktional analysis of the 5' regulatory region and the UUG translation initiation codon of the *Arthrobacter oxidans* 6-hydroxynicotine oxidase gene. *Mol Gen Genet* 221: 427-434.
- 5
- Norton, J. C., J. H. Waggenpack, et al. (1995). "Targeting peptide nucleic acid-protein conjugates to structural features within duplex DNA. *Bioorg Med Chem* 3(4): 437-45.
- 10
- Oikawa, S., M. Kurasaki, et al. (1995). "Oxidative and non-oxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* 34(27): 8763-70.
- 15
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1:1,25-1.28.
- 20
- Sergeev, D. S., T. S. Godovikova, et al. (1995). "Cleavage of a double-stranded DNA target by bleomycin derivatives of oligonucleotides, forming a ternary complex. *Bioorg Khim* 21(3): 188-96.
- 25
- Vesely Z., Müller A, Schmitz G, Kaluza K, Jarsch M, Kessler C (1990) *RleAI* : a novel class - IIS restriction endonuclease from *Rhizobium leguminosarum* recognizing 5'-CC-CACA(N12/9)-3', *Gene* 95: 129-131.
- 30
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotid sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33: 103-109.

Patentansprüche

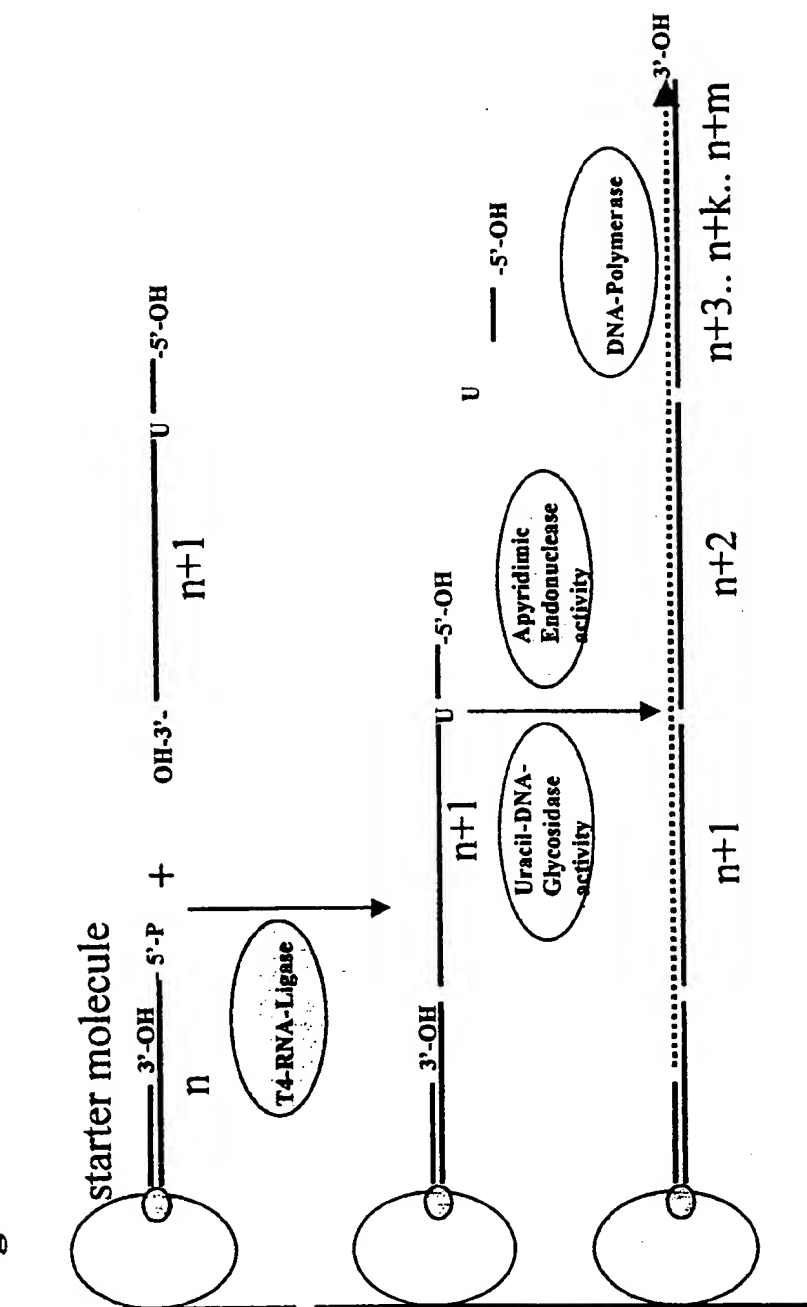
1. Verfahren zur Synthese von Nucleinsäuremolekülen, das die folgenden Schritte umfaßt:
 - 5 (1) Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das mindestens ein Ende aufweist, das eine Anlagerung und/oder Verknüpfung von bzw. mit einem weiteren Nucleinsäuremolekül erlaubt;
 - (2) Anlagerung und/oder Verknüpfung mindestens eines weiteren Nucleinsäuremoleküls an das bzw. mit dem Nucleinsäuremolekül, wobei das eine Ende des mindestens einen weiteren Nucleinsäuremoleküls an das bzw. mit dem mindestens einen Ende des Nucleinsäuremoleküls angelagert und/oder verknüpft wird und das andere Ende des mindestens einen weiteren Nucleinsäuremoleküls im Falle einer Verknüpfung maskiert ist;
 - 10 (3) Maskierung des mindestens einen Endes des Nucleinsäuremoleküls, an das bzw. mit dem kein weiteres Nucleinsäuremolekül angelagert und/oder verknüpft wurde;
 - (4) Spaltung des mindestens einen weiteren angelagerten und/oder verknüpften Nucleinsäuremoleküls an einer vorbestimmten Stelle, wobei die Maskierung entfernt wird, und ein Ende erzeugt wird, das eine Anlagerung und/oder Verknüpfung von bzw. mit einem weiteren Nucleinsäuremolekül erlaubt; und
 - 15 (5) mindestens ein-, gegebenenfalls mehrmalige Wiederholung der Schritte (2) bis (4), wobei in Schritt (2) jeweils geeignete Nucleinsäuremoleküle eingesetzt werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das weitere Nucleinsäuremolekül ein Einzelstrangmolekül ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, das nach Schritt (2) folgenden Schritt umfaßt:
 - (2a) Auffüllung des zweiten, zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nucleinsäurestrangs durch eine Polymeraseaktivität, wobei gegebenenfalls zuvor die Maskierung entfernt wird.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 2, das nach Schritt (4) oder (5) folgenden Schritt umfaßt:
 - (4/5a) Auffüllung des zweiten, zum Einzelstrang in seiner Sequenz komplementären Nucleinsäurestrangs durch eine Polymeraseaktivität.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei nicht in das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül inkorporierte weitere Nucleinsäuremoleküle, Fragmente davon und/oder Nucleotide nach Schritt (2), (2a), (3), (4), (4a), (5) und/oder (5a) abgetrennt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die vorbestimmte Stelle des Nucleinsäuremoleküls durch Inkorporation eines artifiziellen oder modifizierten Nucleotids, eines Basenanalogs, einer artifiziellen Haarnadelstruktur erzeugt wird, das/die/der mittels eines physikalischen, chemischen oder enzymatischen Verfahrens gespalten werden kann.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das artifizielle oder modifizierte Nucleotid 5-Hydroxy-2-desoxycytidin, 5-Hydroxy-2-desoxyuridin, oder 5-Hydroxy-2'-desoxyuridin ist.
- 40

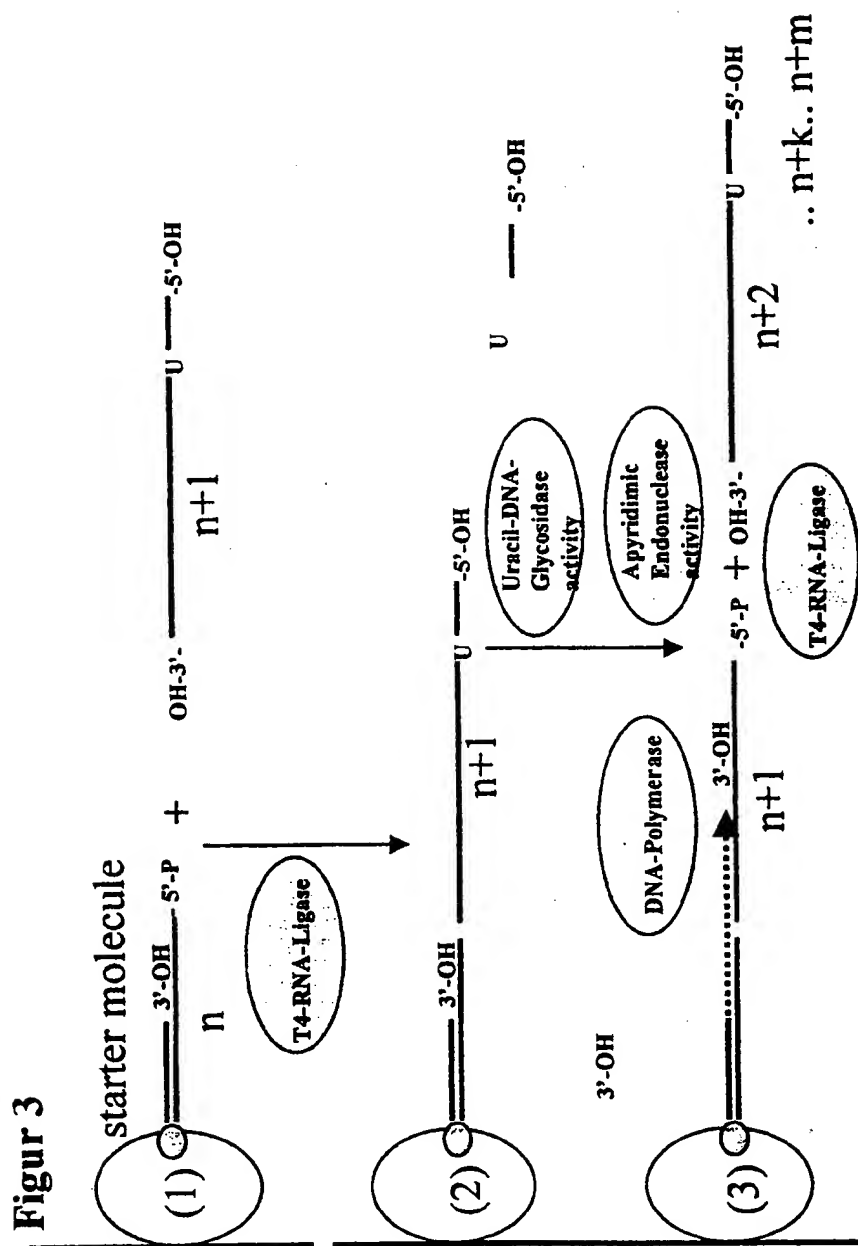
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Verknüpfung von zwei endständigen Nucleotiden über ein 3'-Hydroxy- und ein 5'-Phosphat-Ende mit Hilfe einer Ligaseaktivität, und die Anlagerung über die Hybridisierung komplementärer Sequenzen erfolgen.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Nucleinsäuren DNA oder RNA ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Maskierung in Schritt (3) additiv oder substraktiv durch Hinzufügung bzw. Entfernung einer chemischen Gruppe oder eines chemischen Moleküls erfolgt.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Maskierung durch eine Phosphatase-, eine terminale Transferase-, eine Polymerase- oder eine Exonuclease-Reaktion oder chemisch erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Maskierung eines 5'-Endes durch das Entfernen der Phosphat-Gruppe(n) oder den Einbau eines 5'-modifizierten Nucleotids erfolgt.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei sich ein maskiertes 3'-Ende durch das Vorhandensein eines Aminoblocks, eines Didesoxynucleotids, eines 3'-Phosphats oder eines künstlichen 5'-Endes auszeichnet.
- 20 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das weitere Nucleinsäuremolekül nach Anlagerung und/oder Verknüpfung an dem vom bereitgestellten Nucleinsäuremolekül entfernten Ende eine Haarnadelschleife ausbildet, die als Primer für die Polymeraseaktivität dient.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Spaltung an einer vorbestimmten Stelle in Schritt (4) durch eine sequenzspezifisch spaltende tripelhelikale DNA oder durch eine Typ II S Restriktionsendonuklease erfolgt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Typ II S Restriktionsendonuklease das Rle AI-Enzym aus *Rhizobium leguminosarum* ist.
- 30 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei das bereitgestellte Nucleinsäuremolekül und/oder die weiteren Nucleinsäuremoleküle synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs sind.
- 35 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die Synthese zumindest teilweise automatisiert ist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Synthese matrixgebunden durchgeführt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Matrix aus Nylon, Glas wie CPG-Glas und Glaswolle, Silikat, Latex, Polystyrol, Epoxid oder Silizium ist.
- 5 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei das synthetisierte Nucleinsäuremolekül nach der Synthese isoliert wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei das synthetisierte Nucleinsäuremolekül nach der Synthese bei terminalem Einbau von Primersequenzen mittels einer geeigneten Methode amplifiziert wird.
- 10 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei einzelne synthetisierte Nucleinsäuremoleküle nach der Synthese zu noch größeren DNA-Moleküleinheiten verbunden werden, gegebenenfalls über Restriktionsenzym Typ IIS – Termini vermittelt.
- 15 24. Kit, umfassend:
- (a) eine Ligase, und/oder
 - (b) eine Polymerase,
 - (c) ggf. ein Typ II S-Restriktionsenzym,
 - (d) ggf. eine Uracil-DNA-Glycosylase und eine Apyrimidase und/oder eine Endonuclease III und eine
 - 20 Formamidopyrimidin DNA Glycosylase und/oder ein „mismatch repair“ Enzym,
 - (e) gegebenenfalls eine Phosphatase, eine terminale Transferase und/oder eine Exonuklease,
 - (f) gegebenenfalls einen Waschpuffer zur Elution von Reaktionsnebenprodukten und nicht in das Produkt der erfindungsgemäßen Synthese eingebautem Material,
 - (g) gegebenenfalls eine Synthesematrix mit einem gegebenenfalls bereits daran gebundenen
 - 25 Nucleinsäuremolekül als Startermolekül,
 - (h) gegebenenfalls geeignete Reaktionspuffer für die in (a) bis (e) aufgeführten Enzyme.

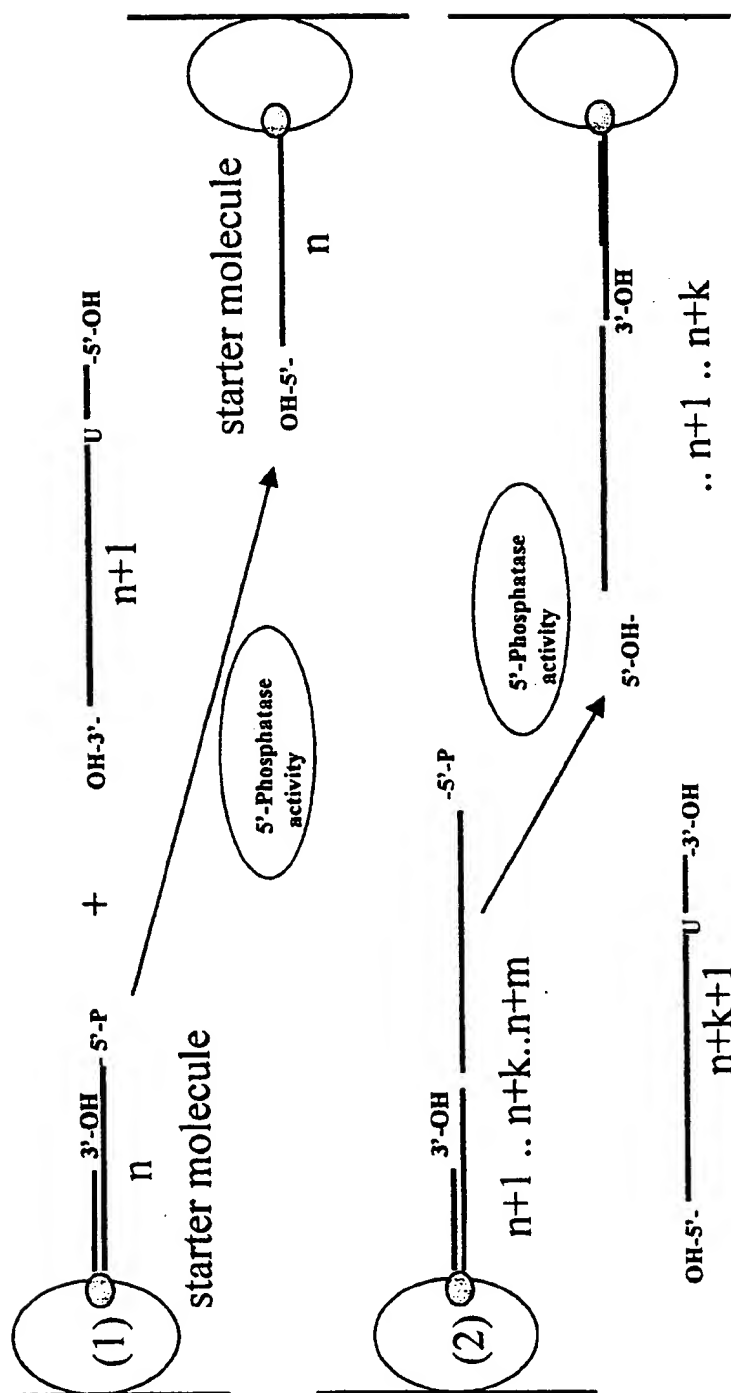


Figur 2

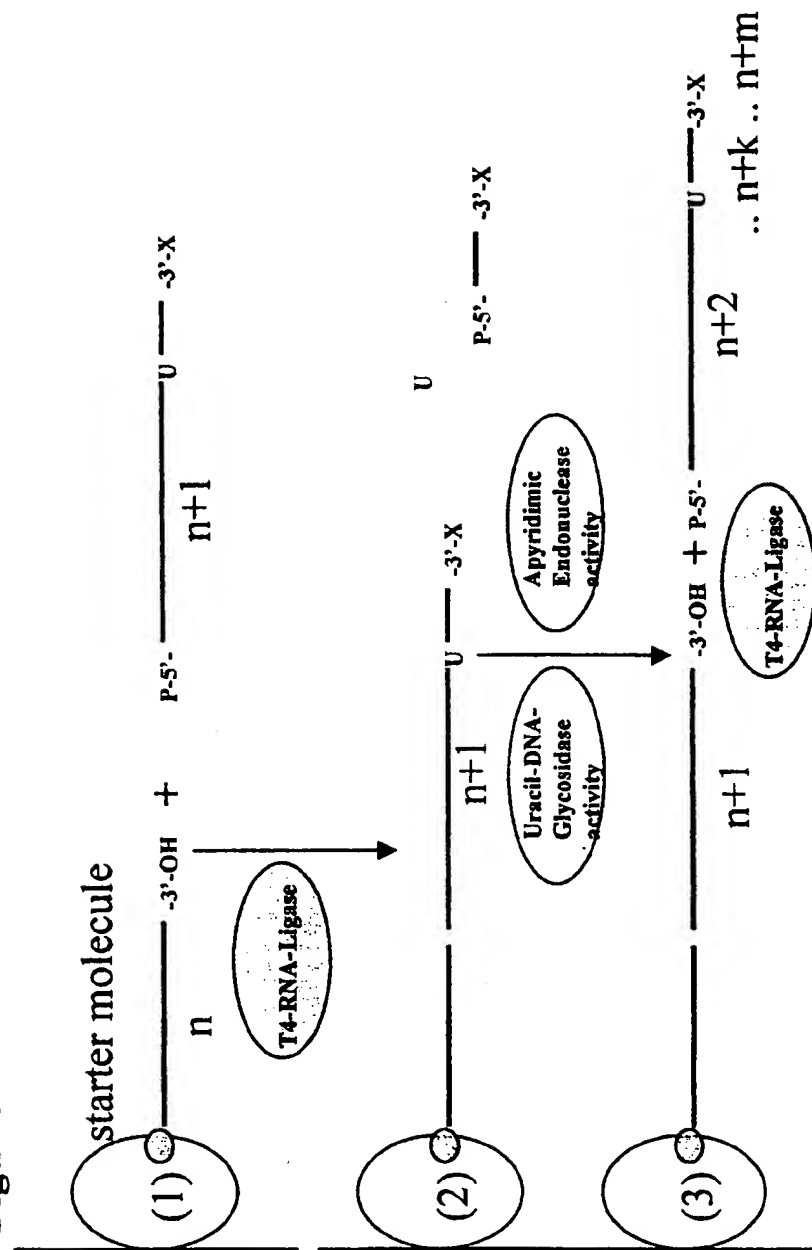




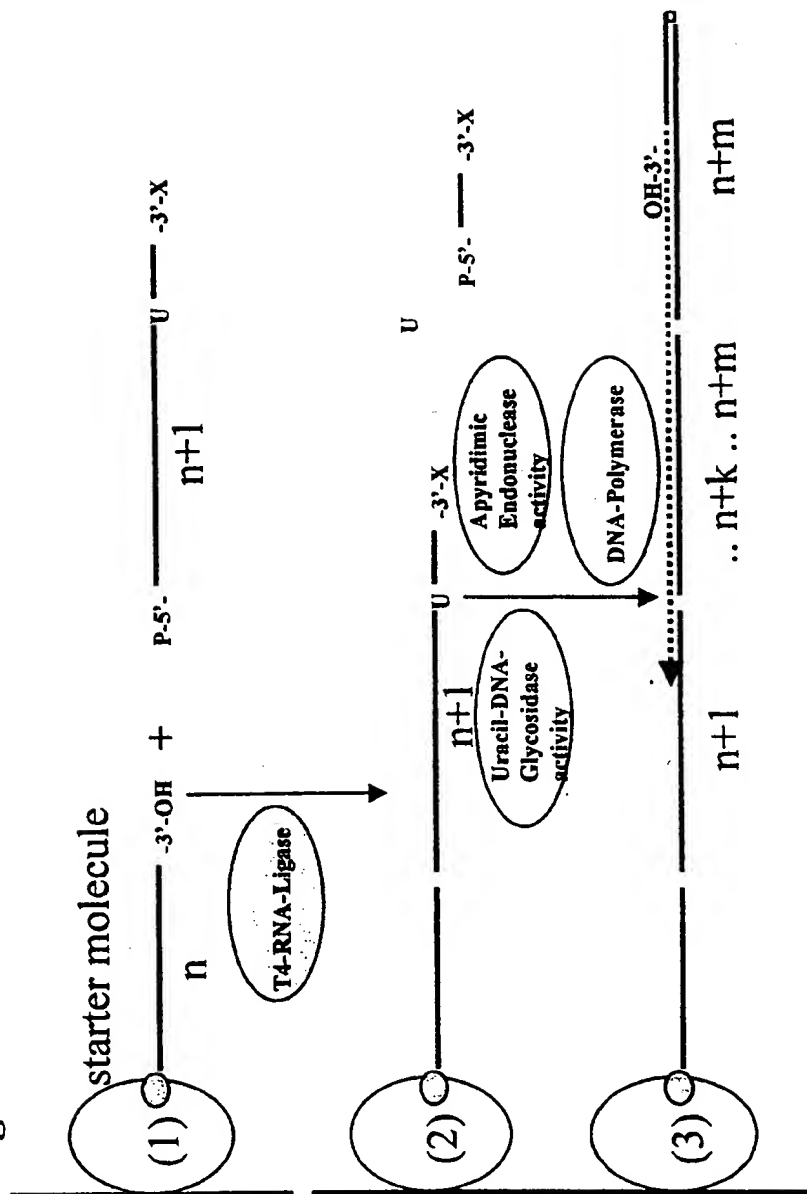
Figur 4



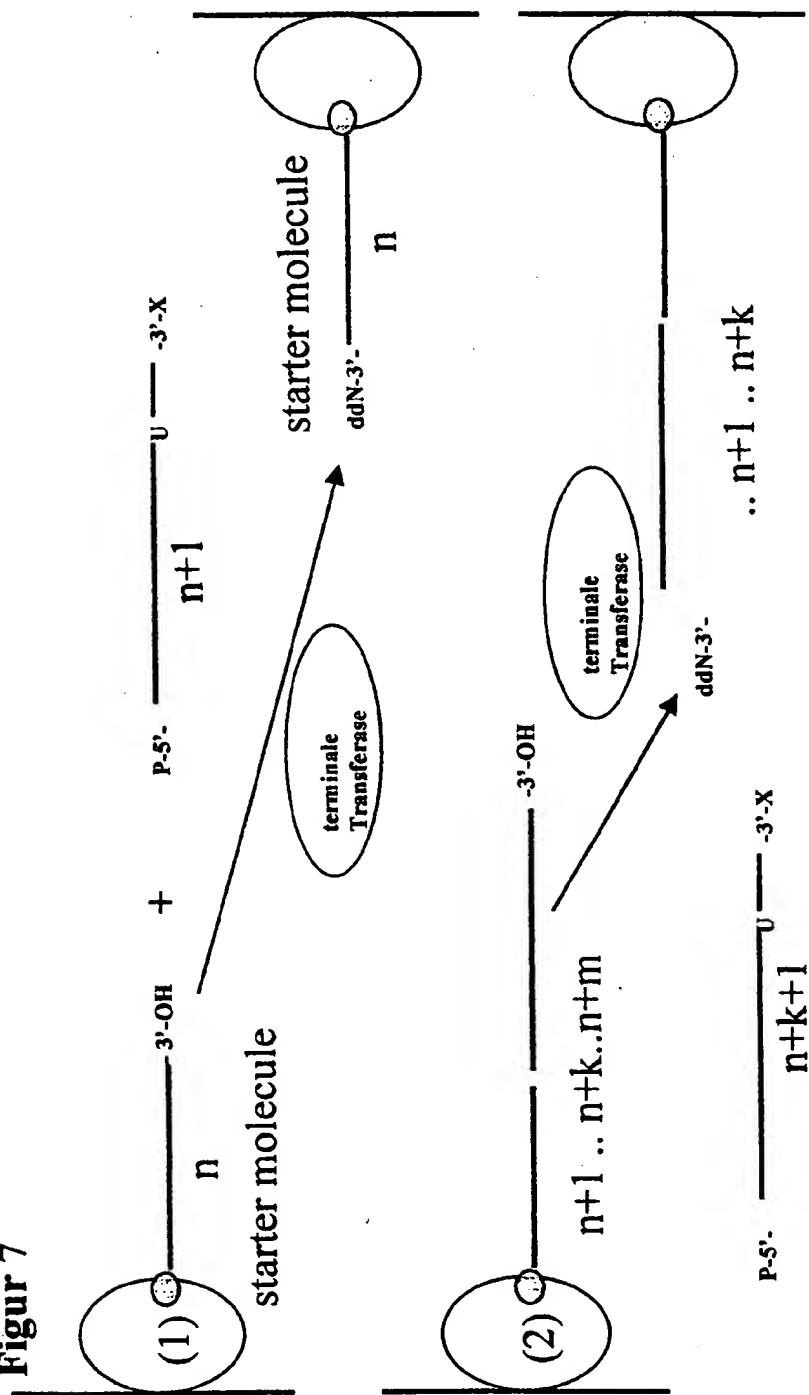
Figur 5



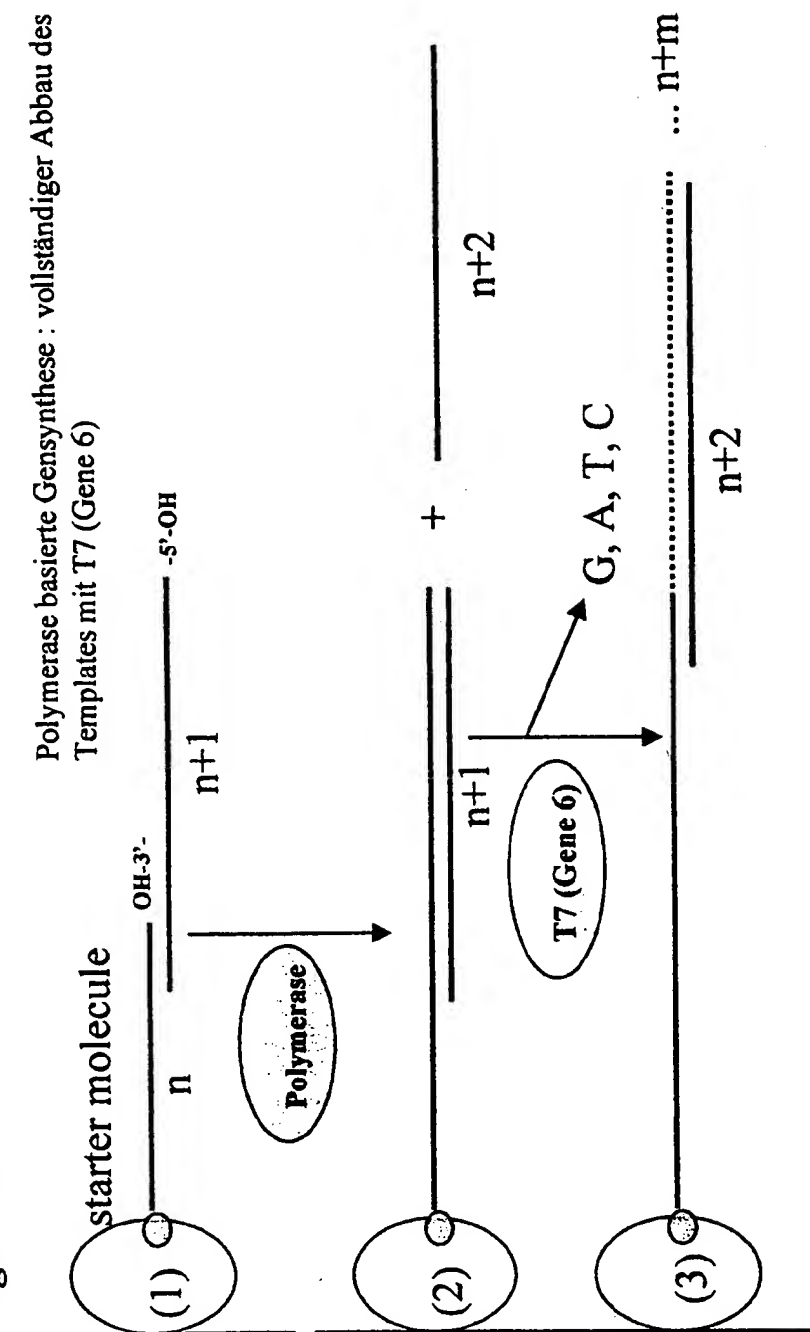
Figur 6



Figur 7



Figur 8A



Figur. 8B

Polymerase basierte Gensynthese : Partialabbau des terminalen Doppelstranges mit Exonuklease III

